

ROBERTA RAFAELA TREVISAN

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS
CASCAS DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent ULMACEAE**

**CURITIBA
2010**

ROBERTA RAFAELA TREVISAN

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS
CASCAS DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent ULMACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Marilis Dallarmi Miguel

Co-orientadores: Prof.^o Dr. Obdulio Gomes Miguel

**CURITIBA
2010**

“Quanto melhor é adquirir a
sabedoria do que o ouro!
E quanto mais excelente,
adquirir a prudência do que a prata.”

(Provérbios 16.16)

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus por me conceder vida, saúde e sabedoria, para realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel, pela orientação, motivação, confiança, dedicação e conselhos.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela co-orientação, ensinamentos, confiança, paciência e dedicação.

À Prof^a. Dr^a. Sandra M. W. Zanin e esposo Pedro Zanin pelo apoio, confiança, fé e alegria.

Ao botânico Gert Hatschbach, pela identificação taxonômica e depósito do exemplar da espécie.

À Prof^a. Dr^a. Ana Luísa Lacava Lordello, do Departamento de Química da UFPR, pela contribuição na elucidação e identificação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , ajuda e apoio.

Ao Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFPR pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR, representado pela Prof^a. Wanda N. Abrahão e Geni Peruzzo, pela cooperação na avaliação da atividade antibacteriana.

Aos colegas dos Laboratórios de Farmacotécnica e Fitoquímica em especial à Msc. Cristina Peitz, pela orientação, apoio e paciência e a Msc. Cristina Mayumi Sasaki, pela

obtenção dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e orientação e apoio, e às colegas de mestrado Andrezza F. Philippsen e Milena Kalegari, pelo companheirismo e apoio.

Ao funcionário da UFPR Paulo Sérgio Diniz pela contribuição com o desenvolvimento do trabalho.

À minha grande amiga Maria Consilia Bocchetti de Lara pela amizade, incentivo e carinho.

À minha família que tanto me apoiou, e me suportou nos momentos de estresses.

A todos os meus amigos de uma maneira geral que me incentivaram e apoiaram.

RESUMO

A espécie *Celtis iguanaea* é popularmente conhecida como esporão de galo ou grão de galo. As folhas são utilizadas pela população para o tratamento de dores no corpo e no peito, para reumatismo, asma, cólicas, má digestão e como diurético, as raízes são utilizadas para infecções urinárias e as cascas para a febre. O presente trabalho objetivou contribuir para o estudo fitoquímico, antioxidante, alelopático, antimicrobiano e de toxicidade das cascas de *Celtis iguanaea*. O extrato etanólico foi submetido à partição com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila. As substâncias β -sitosterol (esteroide), a friedelina e o epifriedelinol (triterpenos) foram isolados da fração hexano e a substância *N-trans-p*-coumaroil tiramina uma amida inibidora da enzima acetilcolinesterase, foi isolada da fração clorofórmio. As substâncias foram identificadas por meio de métodos espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C . A fração clorofórmio apresentou uma atividade antioxidante equivalente a da rutina e a fração acetato de etila equivalente a 60 % da atividade da vitamina C. O extrato bruto na concentração de 0,1 mg apresentou atividade alelopática, inibindo o crescimento do hipocótilo em 34,97 % e estimulando o crescimento da radícula em 29,64 % de *Lactuca sativa*. No ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* apresentou uma LC50 superior a 1000 μmL , e não apresentou atividade antibacteriana significativa frente às cepas testadas.

Palavras-chave: *Celtis iguanaea*; β sitosterol; friedelina; epifriedelinol; *N-trans-p*-coumaroil tiramina; atividade antioxidante; atividade alelopática; *Lactuca sativa*; *Artemia salina*; toxicidade; atividade antibacteriana

ABSTRACT

The specie *Celtis iguanaea*, is popularly known as “esporão de galo” and “grão de galo”. The leaves are used by the population to treat body and chest aches, rheumatism, asthma, colic, poor digestion and as diuretic, the roots are used for urinary tract infections and barks are used for fever. This work aimed to contribute to antioxidant, allelopathic, antimicrobial and toxicity activities and phytochemical study of *Celtis iguanaea* barks. Ethanolic extract was submitted to partition with hexane, chloroform and ethyl acetate. Tree substances, β -sytosterol (steroid), friedelin and epifriedelinol (triterpenes) were isolated from the hexane fraction, and N-trans-p-coumaroyltiramine, an amide inhibitor of the enzyme acethylcolinesterase, was isolated from the chloroform fraction and all these substances were identified by using spectroscopic methods, ^1H and ^{13}C NMR. The chloroform fractions demonstrated antioxidant activity equivalent of the rutine and the ethyl acetate fraction equivalent for 60 % of the activit of the vitamin C. The extract ethanolic in 0,1 mg concentration showed allelopathic activity inhibiting the hypocotyls growth in 34,97 % and stimulating the growth of radicle in 29,64 % of *Lactuca sativa*. The toxicity was tested front the *Artemia salina*, that showed a LC50 values greater than 1000 $\mu\text{g/ml}$, and did not present antimicrobial activity significant front the cepas tested.

Key words: *Celtis iguanaea*; β sytosterol; friedelin; epifriedelinol; N-trans-p-coumaroyltiramine; antioxidant activity; allelopathic activity; *Lactuca sativa*; *Artemia salina*, toxicity; antimicrobial activity

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE QUADROS	16
LISTA DE GRÁFICOS	17
LISTA DE TABELAS	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	24
3.2 FAMÍLIA ULMACEAE	24
3.2.1 Descrição taxonômica.....	24
3.2.2 Espécies de importância do ponto de vista fitoquímico.....	25
3.3 GÊNERO <i>Celtis</i>	28
3.4 <i>Celtis iguanaea</i>	31
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	34
3.5.1 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	34
3.5.2 Alelopatia	35
3.5.3 Atividade antimicrobiana	37
3.5.4 Atividade antioxidante	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	41
4.2 FASES NO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	42
4.2.1 Ensaio sistemático para análise fitoquímica das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	43
4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico.....	43
4.2.1.1.1 Fracionamento do extrato hidroalcoólico.....	43
4.2.1.1.2 Pesquisa de alcaloides.....	43
4.2.1.1.3 Pesquisa de flavonoides.....	44
4.2.1.1.3.1 Pesquisa de leucoantocianidinas.....	44
4.2.1.1.3.2 Pesquisa de heterosídeos flavônicos.....	44
4.2.1.1.3.3 Pesquisa de flavonóis.....	45

4.2.1.1.3.4 Pesquisa de diidroflavonoides.....	45
4.2.1.1.3. 5 Pesquisa de diidroflavonóis.....	46
4.2.1.1.4 Pesquisa de cumarinas.....	46
4.2.1.1.5 Pesquisa de antraquinonas.....	47
4.2.1.1.6 Pesquisa de esteróides e triterpenos - reação de Liberman Bouchard..	47
4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso.....	47
4.2.1.2.1 Pesquisa de antocianinas.....	48
4.2.1.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	48
4.2.1.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogénicos.....	48
4.2.1.2.4 Pesquisa de taninos.....	49
4.2.1.2.5 Pesquisa de aminogrupos.....	49
4.2.2 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	49
4.2.2.1 Obtenção do extrato bruto das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	49
4.2.2.2 Fracionamento do extrato bruto das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	50
4.2.2.3 Isolamento das substâncias obtidas das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	51
4.2.2.4 Metodologia de identificação das substâncias isoladas das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	52
4.2.3 ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	52
4.2.3.1 Estudo da atividade alelopática.....	53
4.2.3.1.1 Preparo das amostras.....	53
4.2.3.1.2 Preparo do material.....	53
4.2.3.1.3 Teste de germinação.....	54
4.2.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana.....	55
4.2.3.2.1 Difusão em disco.....	55
4.2.3.2.1.1 Preparo do inóculo.....	56
4.2.3.2.1.2 Teste da atividade antibacteriana.....	56
4.2.3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM).....	57
4.2.3.2.2.1 Preparo do inóculo.....	57
4.2.3.2.2.2 Preparo das amostras.....	57
4.2.3.2.2.3 Teste da concentração inibitória mínima (CIM).....	57
4.2.3.3 Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	58

4.2.3.3.1 Preparo da solução salina.....	58
4.2.3.3.2 Eclosão dos ovos.....	58
4.2.3.3.3 Preparo das amostras.....	58
4.2.3.3.4 Avaliação da toxicidade.....	59
4.2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	59
4.2.3.4.1 Formação do complexo fosfomolibdênio.....	59
4.2.3.4.2 Redução do radical DPPH.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 ENSAIOS SISTEMÁTICOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FRAÇÕES E EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	61
5.2 PORCENTAGEM DE RESÍDUOS SECOS DAS FRAÇÕES DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	62
5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXANO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	63
5.3.1 Identificação estrutural da substância FH-1 isolada da fração hexano das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	63
5.3.2 Identificação estrutural da substância FH-2 isolada da fração hexano das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	70
5.3.3 Identificação estrutural da substância FH-3 isolada da fração hexano das cascas de <i>Celtis iguanaea</i>	76
5.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA FC-4 ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	82
5.5 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Celtis iguanaea</i>	88
5.5.1 Avaliação do crescimento.....	88
5.5.2 Avaliação da germinação.....	91
5.6 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i> FRENTE À <i>Artemia salina</i>	93
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS CASCAS <i>Celtis iguanaea</i>	94
5.7.1 Ensaio pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.....	94
5.7.2 Ensaio pelo método de redução do radical DPPH.....	95
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO E	

FRAÇÕES DE <i>Celtis iguanaea</i>	98
5.8.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CIM).....	98
5.8.2 Difusão em disco.....	98
6 CONCLUSÃO	99
7 SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS	102
REFERÊNCIAS	103

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AAR%	- Atividade Antioxidante Relativa
ATCC	- American Type Culture
BaCl ₂	- Cloreto de Bário
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CCl ₄	- Tetracloreto de carbono
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CS	- Controle Solvente
CUPc	- Concordância de Uso Popular Corrigida
DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DPPH	- 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
EBE	- Extrato Bruto Etanólico
FAE	- Fração Acetato de Etila
FC	- Fração Clorofórmio
FH	- Fração Hexano
FR	- Fração Remanescente
HCL	- Ácido Clorídrico
H ₂ SO ₄	- Ácido Sulfúrico
IC%	- Porcentagem de Atividade Antioxidante
IVG	- Índice de Velocidade de Germinação
LC50	- Concentração Média Letal
KBr	- Brometo de Potássio
KCl	- Cloreto de Potássio
kDa	- Quilo Dalton
MBM	- Museu Botânico Municipal
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
Mo	- Molibidênio
NaCl	- Cloreto de Sódio
Na ₂ CO ₃	- Carbonato de Cálcio
Na ₂ SO ₄	- Sulfato de sódio
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear

TAS	- Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>
UDN	- <i>Ulmus davidiana</i> Nakai
UV	- Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Trema orientalis</i>	26
FIGURA 2	ESTRUTURA QUÍMICA DAS DAVIDIONAS E MANSONONAS ISOLADAS DE <i>Ulmus davidiana</i>	28
FIGURA 3	ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO <i>TRANS-N-P</i> -COUMAROILTIRAMINA ISOLADO DE <i>Celtis sinensis</i>	29
FIGURA 4	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Celtis sinensis</i>	29
FIGURA 5	ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE <i>Celtis australis</i>	30
FIGURA 6	ESTRUTURA QUÍMICA DOS TRITERPENOS TÓXICOS ISOLADOS DE <i>Celtis philippinensis</i>	30
FIGURA 7	ESTÍPULAS TRANSFORMADAS EM ESPINHOS DE <i>Celtis iguanaea</i>	32
FIGURA 8	FRUTOS DE <i>celtis iguanaea</i>	33
FIGURA 9	ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	42
FIGURA 10	APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO PARA PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS CASCAS DE <i>Celis iguanaea</i>	50
FIGURA 11	APARELHO DE SOXHLET ADAPTADO PARA O PARTICIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE <i>Celis iguanaea</i>	51
FIGURA 12	CAIXA GERBOX COM 20 SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	54
FIGURA 13	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO HEXANO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	63
FIGURA 14	ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FH-1.....	64
FIGURA 15	ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1..	65
FIGURA 16	ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1 COM VALORES DE DESLOCAMENTO.....	66
FIGURA 17	ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1	

	EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0,725 À 2,392 δ	66
FIGURA 18	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1.....	67
FIGURA 19	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1 EXPANDIO NA REGIÃO DE 14,67 À 59,47 δ ...	68
FIGURA 20	ESPECTRO DE RMN DEPT 135° SUBSTÂNCIA FH-1 EXAPANDIDO NA REGIÃO ENTRE 6,8 À 59,4 δ	68
FIGURA 21	ESTRUTURA DA FRIEDELINA.....	70
FIGURA 22	ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FH-2.....	71
FIGURA 23	ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-2..	72
FIGURA 24	ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-2..	72
FIGURA 25	ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-2 EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0,724 À 1,355 δ	73
FIGURA 26	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-2.....	74
FIGURA 27	ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FH-2.....	74
FIGURA 28	ESTRUTURA DO EPIFRIEDELINOL.....	76
FIGURA 29	ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FH-3.....	77
FIGURA 30	ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-3..	78
FIGURA 31	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-3.....	79
FIGURA 32	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-3 EXPANDIDO NA REGIÃO DE 11,8 À 71,8 δ	79
FIGURA 33	ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FH-3.....	80
FIGURA 34	ESTRUTURA DO β SITOSTEROL.....	82
FIGURA 35	ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FC-4.....	83
FIGURA 36	ESPECTRO DE RMN ^1H (CH_3OH , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FC-4	84
FIGURA 37	ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA FC-4 (CH_3OH , 50 Hz)	85
FIGURA 38	ESPECTRO DE RMN ^{13}C (CH_3OH , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FC-4 EXPANDIDO DE 35,9 À 42,6 δ	85
FIGURA 39	ESPECTRO DE RMN ^{13}C (CH_3OH , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FC-4 EXPANDIDO DE 116,3 À 169,3 δ	86
FIGURA 40	ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FC-4.....	86

FIGURA 41	ESTRUTURA DO <i>N-trans-p</i> -coumaroil tiramina.....	88
FIGURA 42	CAIXA GERBOX APÓS 7 DIAS DE GERMINAÇÃO.....	88
FIGURA 43	REAÇÃO DE REDUÇÃO DO DPPH.....	95

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Celtis iguanaea</i>	24
QUADRO 2	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Celtis iguanaea</i>	61
QUADRO 3	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Celtis</i> <i>iguanaea</i>	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i> COM OS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C	95
-----------	--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	RESÍDUOS SECOS DAS FRAÇÕES EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE MATERIAL VEGETAL USADA NA EXTRAÇÃO <i>Celtis iguanaea</i>	62
TABELA 2	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ PARA FH-1 E DADOS DA LITERATURA PARA A FRIEDELINA (ARAGÃO <i>et al.</i> , 1990).....	69
TABELA 3	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ PARA FH-2 E DADOS DA LITERATURA PARA O EPIFRIEDELINOL (ARAGÃO <i>et al.</i> , 1990).....	75
TABELA 4	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ PARA FH-3 E DADOS DA LITERATURA PARA O β SITOSTEROL (KOJIMA; HATANO, 1990).....	81
TABELA 5	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^1H PARA A FC-4 E DADOS DA LITERATURA PARA O <i>N-TRANS-P-COUMAROILTIRAMINA</i> (KUO <i>et al.</i> , 2007).....	87
TABELA 6	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ PARA FC-4 E DADOS DA LITERATURA PARA O <i>N-TRANS-P-COUMAROILTIRAMINA</i> (KUO <i>et al.</i> , 2007; KIM; LEE, 2003).....	87
TABELA 7	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA COM O EXTRATO BRUTO E AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	90
TABELA 8	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO COM O EXTRATO BRUTO E AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	91
TABELA 9	TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE <i>Lactuca sativa</i> NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM O EXTRATO BRUTO E AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	92

TABELA 10	ANÁLISE DE TOXICIDADE DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i> SOBRE <i>Artemia salina</i>	93
TABELA 11	AAR% (VITAMINA C) DA RUTINA, DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO E ACETATO DE ETILA DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i>	94
TABELA 12	EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA DO GRÁFICO AA% VERSUS CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE.....	96
TABELA 13	CONCENTRAÇÃO EM µg/mL NECESSÁRIA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i> , E DOS PADRÕES VITAMINA C E RUTINA PARA REDUZIR 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH.....	97
TABELA 14	MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE <i>Celtis iguanaea</i> , NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM DISCO.....	98
TABELA 15	MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM DISCO.....	99

1 INTRODUÇÃO

Independente se de ordem espiritual ou física, o homem primitivo sempre buscou na natureza as soluções para os diversos males que o assolava (PALMEIRA, 1990). Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seus conhecimentos a fim de melhoria nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução (MIGUEL, 2000).

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As civilizações primitivas cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada como um tesouro precioso (CUNHA, 2008).

Com certeza, inúmeras espécies vegetais foram incorporadas à medicina tradicional, única e exclusivamente, pelo acaso, caracterizado pelo uso empírico de espécies vegetais, seguido de avaliação, mesmo que rústica e grosseira, dos sinais e sintomas que apareciam após seu consumo, até selecionar pela qualidade de respostas, se determinada espécie seria útil ou não. O método usado é o mesmo ainda, o da tentativa e erro, ainda muito comum e útil em pesquisas de diversas áreas do conhecimento científico, que serve para mostrar a forte ligação entre o conhecimento popular e o científico (STASI, 1996).

Com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, os produtos sintéticos foram adquirindo primazia no tratamento farmacológico. Isto ocorreu, entre outros fatores, pela maior facilidade de obtenção de compostos puros, possibilidade de modificações estruturais (com vistas a fármacos mais ativos e mais seguros) e pelo crescente poder econômico das grandes companhias farmacêuticas. Além disso, a utilização de produtos naturais, pelo seu paralelo com o desenvolvimento da cultura humana, foi e muitas vezes, é acompanhada de significados mágico-religiosos e visões peculiares de saúde e doença, dentro de cada cultura. Atualmente está ressurgindo o interesse pelas mesmas na terapêutica. O crescimento da procura de fármacos vegetais relaciona-se a vários fatores, como contra-indicações, efeitos colaterais e prejuízos causados pelo uso

abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos, o fato de que amplas camadas da população mundial não têm acesso aos medicamentos e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

Recentemente, os estudos com plantas medicinais têm sido responsáveis por inúmeras e importantes descobertas; o desenvolvimento desta área de pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais. No entanto, resultados promissores dependem de uma maior inter-relação entre os diversos profissionais e disciplinas que compõem o estudo das plantas medicinais, pois a continuidade de tais estudos de forma isolada perpetuará a falta de resultados, impedindo consequentemente o desenvolvimento de novos medicamentos (STASI, 1996).

As pesquisas científicas iniciaram na tentativa de comprovar a identidade botânica, composição química e ação farmacológica dos fármacos vegetais, agrupando aquelas de efeito semelhante. Essas pesquisas buscaram determinar as estruturas químicas envolvidas, reprodução das estruturas quimicamente ativas, e a promoção de modificações estruturais. Esses estudos possibilitaram a proposição de maior atividade terapêutica, junto aos requisitos de qualidade e ausência de toxicidade (MIGUEL, 2000).

De acordo com as perspectivas da modernidade, a saúde do futuro estará voltada para a medicina preventiva, onde a ciência buscará na natureza, meios profiláticos que auxiliem o homem na defesa de seus males (MIGUEL, 2000).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000. Sendo que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES *et al.*, 2003).

As oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies. Alcaloides vegetais têm se mostrado especialmente efetivos em seus efeitos medicinais e se encontram amplamente distribuídos em muitas espécies de plantas tropicais, exercendo papel importante como substâncias de defesa contra insetos e herbívoros. Um exemplo elucidativo é o de *Catharanthus roseus* G. Don, originário de Madagascar. Essa espécie é fonte de pelo menos 60 alcaloides, dos quais dois deles, a vincristina e vimblastina, efetivos no tratamento de leucemia infantil (SIMÕES *et al.*, 2003).

O conhecimento da composição química da planta pode contribuir positivamente no controle da qualidade de fitoterápicos, pois somente com estas informações pode-se avaliar tecnicamente desde o início do processo, na elaboração do extrato vegetal, até a obtenção do produto final. Deve ser priorizado o desenvolvimento de análises rápidas, de baixo custo e alta especificidade para a garantia de segurança e eficácia do medicamento (LAGOS, 2006).

Além disso, os produtos naturais podem ser usados como elementos, em torno dos quais, pode-se construir uma biblioteca de química combinatória. Cabe citar, por exemplo, a estatina, que foi usada como motivo estrutural de suma importância para criar uma família de inibidores das proteases do vírus HIV (YUNES; CALIXTO, 2001).

Entre várias espécies com utilização popular para fins farmacológicos, destaca-se a espécie *Celtis iguanaea*, uma planta encontrada no Brasil e popularmente conhecida como esporão de galo (SILVA; PROENÇA, 2008), grão de galo (PIO, 1931), joá-mirim, jameri (LORENZI; SOUZA, 1999). Relatos populares indicam o uso de suas folhas sob a forma de chá, para o tratamento de dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má-digestão e como diurético (PEREIRA *et al.*, 2008), e suas folhas e raízes para infecções urinárias (SILVA; PROENÇA, 2008). Rodrigues (2007) em pesquisa etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de florestas estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande, MG, aponta o uso popular da casca do caule de *Celtis iguanaea* para febre.

Este trabalho justifica-se pelo fato de não haver registros na literatura até o momento, da composição química, e possíveis atividades biológicas da espécie.

O estudo da espécie *Celtis iguanaea* poderá contribuir com a caracterização de novos compostos químicos, e atividades biológicas, além de possibilitar o enriquecimento do acervo de bibliografias científicas no âmbito da química de produtos naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com o estudo fitoquímico aplicado às atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea*.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar os grupos fitoquímicos presentes nos extratos hidroalcoólico e aquoso;

Isolar constituintes químicos presentes nos extratos por meio de fracionamento cromatográfico;

Identificar e quantificar constituintes químicos das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, utilizando técnicas de espectroscopia;

Verificar a atividade antibacteriana do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, frente às cepas bacterianas;

Avaliar a atividade alelopática do extrato bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, em diferentes concentrações de uso, sobre a germinação e crescimento das sementes da espécie *Lactuca sativa*;

Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente;

Efetuar ensaio toxicológico do extrato bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, frente a *Artemia salina*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enquadramento taxonômico

Com o avanço de estudos recentes em ultra-estruturas, número de cromossomos, sítios de restrições de DNA, e dados morfológicos, constantemente as espécies costumam ser reenquadradas taxonomicamente e, portanto, dependendo do autor seguido, pode apresentar taxonômicas diferentes. É o que ocorre com os gêneros *Celtis* e *Trema* que pela classificação de Cronquist, (1981), pertencem à família Ulmaceae, mas podem ser classificados também, na família Cannabaceae, segundo os autores Souza; Lorenzi (2005), pois estudos recentes de filogenia enquadram estes gêneros nessa família. Este trabalho, segue a classificação de Cronquist (1981) que classifica o gênero *Celtis* na família Ulmaceae, descrita no Quadro 1.

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Celtis iguanaea*

reino	<i>Plantae</i> - Haeckel, 1866
classe	<i>Magnoliopsida</i> - Brongniart, 1843
ordem	<i>Urticales</i> - Dumortier, 1829
família	<i>Ulmaceae</i> - Mirbel, 1815
subfamília	<i>Celtidoideae</i>
gênero	<i>Celtis</i>
epíteto específico	<i>iguanaea</i> - (Jacq.) Sarg.
nome botânico	<i>Celtis iguanaea</i>

FONTE: *Celtis*, 2009.

3.2 Família Ulmaceae

3.2.1 Descrição taxonômica

A família Ulmaceae pertence à ordem Urticales, que é composta por 6 famílias: Barbeyaceae, Ulmaceae, Cannabaceae, Moraceae, Cecropiaceae e Urticaceae. É constituída de 18 gêneros e 150 ou mais espécies, muito distribuída em regiões tropicais e temperada, especialmente no Hemisfério Norte. Os maiores gêneros são *Celtis* (70), *Trema* (30) e *Ulmus* (20). Espécies de *Ulmus* e *Celtis* são bem conhecidas e cultivadas em regiões temperadas (CRONQUIST, 1981). Dependendo do autor o número de gêneros pode variar de 15-19, e o número de espécies de 150-200. A família *Ulmaceae* está subdividida em duas subfamílias a *Celtidoideae* e *Ulmoideae*.

A família possui alguns representantes nativos no Brasil, embora a maioria dos gêneros esteja representada nas regiões temperadas de ambos os hemisférios; certas espécies do gênero *Ulmus* são cultivadas nos estados sulinos. São plantas lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras, de disposição alterna dística, frequentemente assimétricas na base, de margens serrilhadas e com estípulas. Flores monoclamídeas, hermafroditas (*Celtis*) ou de sexos separados, pequenas, reunidas em inflorescências ou às vezes as femininas isoladas. Pétalas em geral 4-5, raramente menos ou mais (JOLY, 1985).

3.2.2 Espécies de importância do ponto de vista fitoquímico

Trema micrantha é uma planta perene, arbórea, ereta, bastante ramificada, de caule estriado de cor marrom escura, nativa do Brasil, que se propaga por sementes. O extrato de *Trema micrantha* tem demonstrado atividade analgésica e antiinflamatória em ratos e camundongos e suas folhas são usadas no tratamento de doenças de pele, sífilis e reumatismo. Em algumas regiões do Brasil, incluindo a região sul, as folhas em forma de decocto são usadas com função hipoglicemiante. Schoenfelder; Cirimbelli e Zanette (2006) investigaram os efeitos do extrato etanólico sobre os níveis de glicose em ratos diabéticos e chegaram à conclusão que as folhas de *Trema micrantha* apresentaram efeitos benéficos para ratos diabéticos diminuindo os níveis de glicose sanguínea (SCHOENFELDER; CIRIMBELLI; ZANETTE; 2006). Frimmel *et al.*, (2000) isolaram vitexina, paprazina, β sitosterol e o ácido ursacólico das folhas e ramos de *Trema micrantha* Blume. Segundo os autores o isolamento de vitexina de *Trema micrantha* indica que este composto e seus derivados são marcadores químicos do gênero *Trema*, enquanto que paprazina foi o primeiro relato no gênero.

Trema orientalis é uma planta de fácil adaptação no meio e pode ser encontrada em montanhas e planícies da Taiwan. A raiz desta planta é usada na medicina popular para tratamento de traumatismo, hemorragia intestinal e estomacal. Diversos compostos foram isolados e identificados desta espécie, entre eles triterpenos, esteróides, ácidos graxos e flavonóides. Kuo *et al.*, (2007) isolaram do extrato metanólico oito compostos o (-)-ampelopsina F (1), (-)-epicatequina (2), (+)-catequina (3), (+)-siringaresinol (4), *trans*-N-*p*-coumaroil tiramina (5), *trans*-N-*p*-coumaroil octopamina (6), o ácido *trans*-4-hidroxi-cinâmico (7) e 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil-1-O- β -D-glucosídeo (8), conforme Figura 1.

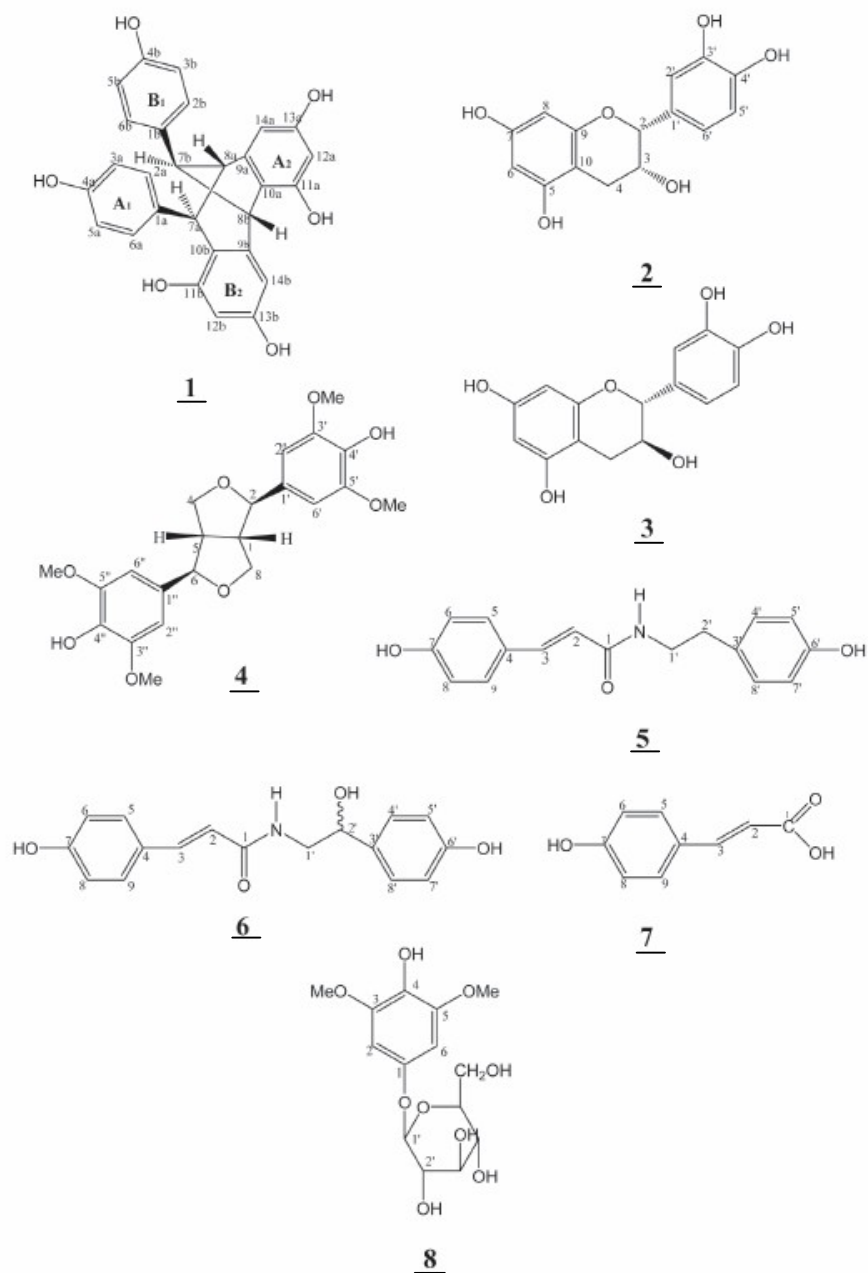


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Trema orientalis*

Ulmus davidiana Planch var. *japonica* Nakai (Ulmaceae) é uma árvore amplamente distribuída nos países orientais. Tradicionalmente suas raízes e cascas dos caules são usadas como chá na Ásia, e na forma de pó seco, como espessante de sopas ou adicionado como farinha de cereal na preparação de pães. Segundo relatos, esta planta pode ser efetiva contra câncer gástrico, desordens gastroentéricas,

erupção, edema, artrite reumatoide, hemorroidas e mastites (JUNG; HEO; WANG, 2008). É uma planta muito distribuída na Coréia e tem sido utilizada como um valioso remédio na medicina tradicional coreana e chinesa para anemia, irregularidade menstrual e constipação intestinal. Também tem sido usada como proteção contra degeneração de cartilagem e regeneração de tecidos danificados (LEE *et al.*, 2007).

Investigações de componentes fitoquímicos da casca da raiz de *Ulmus davidiana* têm resultado no isolamento de compostos como catequina, catequina ramnosideo, catequina apiofuranosideo, ésteres triterpênicos, sesquiterpenos *o*-naftoquinonas, lignanas e lignanas glicosídeos. Algumas atividades medicinais de *Ulmus davidiana* têm sido descritas como efeitos neuroprotetores, atividades antitumoral, inibição do óxido nítrico e atividades antioxidantes (JUNG; HEO; WANG; 2008). Kim *et al.*, (1996) isolaram sete sesquiterpenos orto-naftoquinônicos do extrato hidroalcoólico das cascas da raiz de *Ulmus davidiana*, três novos compostos davidianonas A (9), B (10) e C (11) e quatro compostos conhecidos, mansononas E (12), F (13), H (14), I (15) conforme mostra a Figura 2. Os mesmos pesquisadores estudando a atividade antioxidante dos sete compostos pelo método do ácido tiobarbitúrico chegaram a resultados que mostram os compostos 9, 11, 12 e 13 como possuindo atividades antioxidante, sendo que desses o composto 4 apresentou maior atividade. Ko e Lim, (2006) estudando *Ulmus davidiana* Nakai (UDN), descobriram uma glicoproteína com peso molecular de 116 kDa isolada dessa espécie, a UDN glicoproteína e propuseram que a UDN glicoproteína pode ser efetiva contra doenças que são potencializadas pelos radicais livres, devido a sua forte atividade antioxidante. Para isso examinaram o efeito preventivo da glicoproteína UDN em lesões de fígado de ratos induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄), e chegaram à conclusão, de acordo com os resultados encontrados, que a glicoproteína UDN pode proteger o fígado de ratos de lesões induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄) *in vivo* e por glucose/glucose oxidase *in vitro*, através da capacidade de captar radicais livres. Jung *et al.*, (2007) avaliando a atividade anti-angiogênica do extrato metanólico e das frações de *Ulmus davidiana* var. *japônica*, chegaram a conclusão que a espécie possui uma forte atividade anti-angiogênica, sendo um ponto de partida para a produção de um novo fármaco com essas propriedades. Song *et al.*, (2007) estudaram os efeitos antiinflamatórios em ratos e chegaram a conclusão que *Ulmus davidiana* conduz a supressão da destruição do osso e melhora na inflamação.

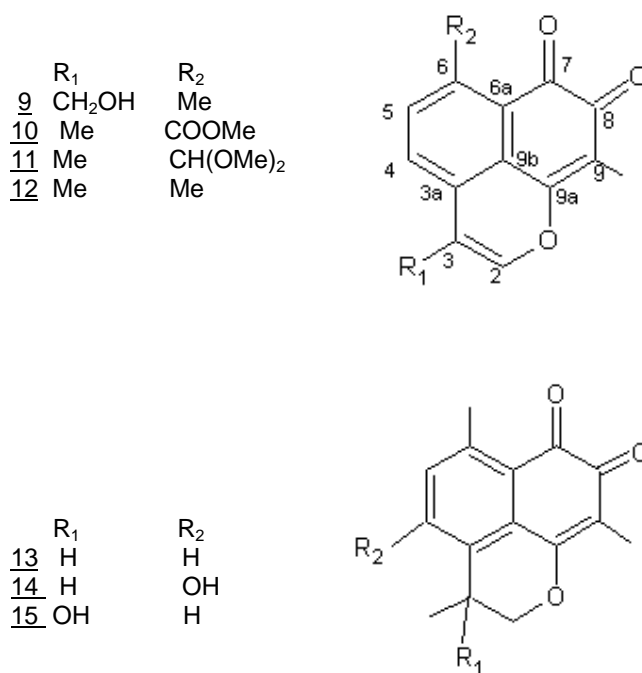


FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS DAVIDIONAS E MANSONONAS ISOLADAS DE *Ulmus davidiana*

3.3 Gênero *Celtis*

O gênero *Celtis* inclui 70 espécies de arbustos ou árvores, principalmente distribuídas em regiões temperadas e tropicais (HWANG *et al.*, 2003). Dentre as espécies de importância destaca-se *Celtis chinensis* ou *Celtis sinensis*, bem distribuída na Coréia e frequentemente usada na medicina popular para cura de doenças gástricas, dor abdominal e urticária. Na Coréia, Japão e China suas cascas são usadas para o tratamento de irregularidades menstruais, doenças gástricas e dores abdominais. Kim; Lee, (2003), isolaram desta espécie o composto *trans-N-p*-coumaroiltiramina, Figura 3, que testado frente à acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise metabólica da acetilcolina, apresentou efeito inibitório sobre a mesma. Mais tarde Kim *et al.*, (2005) dando continuidade ao estudo fitoquímico da espécie, isolaram outros oito compostos do extrato metanólico. Os compostos isolados conforme mostra a Figura 4, foram dois triterpenoides o germanicol (16) e o epifriedelinol (17) este com ação antitumoral de acordo com Kundu, *et al.*, (2000), dois compostos amida o *trans-N*-cafeoil tiramina (18) e o *cis-N*-coumaroiltiramina (19), duas

lignanas glicosídicas a pinoresinol-4-*O*-glicosídeo (20) e a pinoresinol-4-*O*-rutinosídeo (21) (princípio antiinflamatório) e dois esteroides conhecidos o β sitosterol e o β sitosterol-3-*O*-glicosídeo.

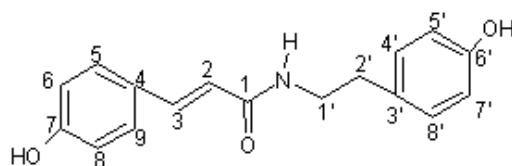


FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO TRANS-N-P-COUMAROILTIRAMINA ISOLADO DE *Celtis sinensis*

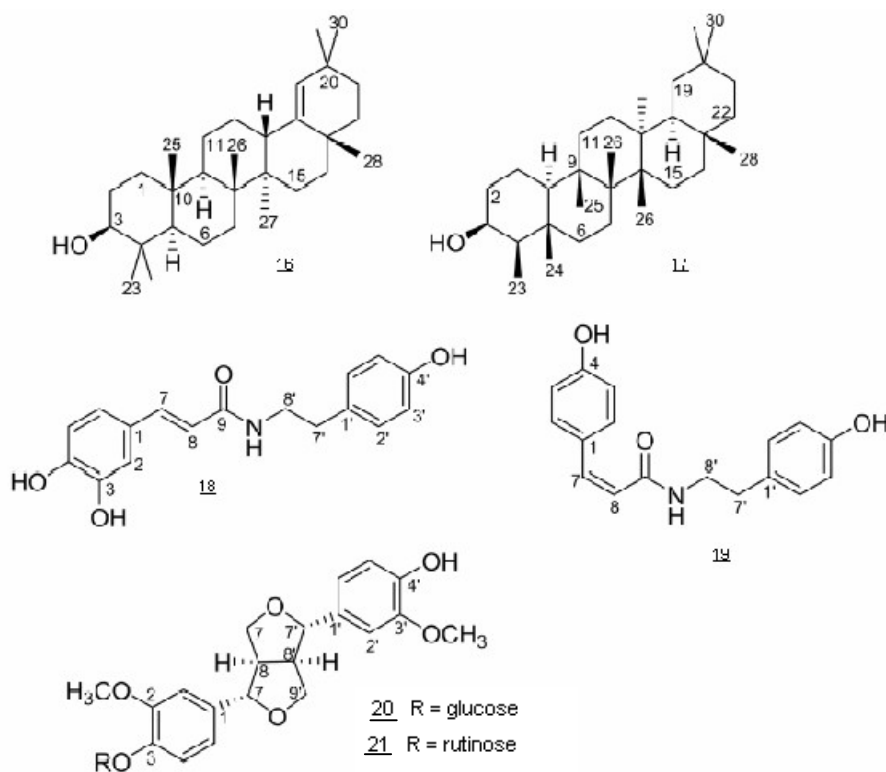


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Celtis sinensis*

Os pesquisadores Spitaler *et al.*, (2009) isolaram 3 flavonóides de *Celtis australis*, o acetina 7-O-glucosídeo (22), isovitexina (apigenina 6-C-glucosídeo) (23), citisósídeo (acetina 8-C-glucosídeo) (24), conforme mostra a Figura 5.

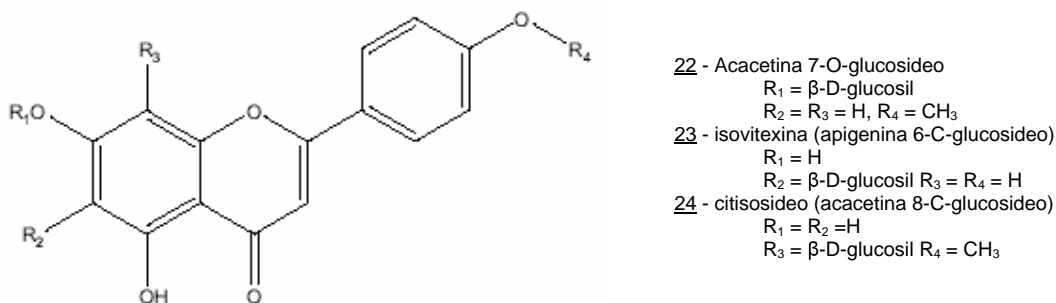


FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *Celtis australis*

Em estudo, Hwang *et al.*, (2003) isolaram dois triterpenos tóxicos de *Celtis philippinensis*, o 3β trans-sinapoiloxilup-20(29)-ene-28-ol, (25) e o 3β trans-feruloiloxi-16 β hidroxilup-20(29)-ene, (26), Figura 6, além de 5 outros compostos triterpênicos conhecidos, o 3β -O-(E)-feruloilbetulino, 3β -O-(E)-coumaroilbetulino, betulino, ácido 20-epibriônico, e o ácido ursólico.

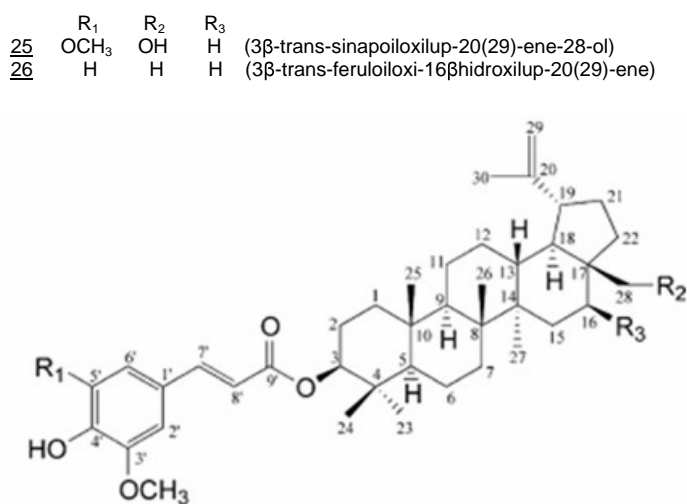


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS TRITERPENOS TÓXICOS ISOLADOS DE *Celtis philippinensis*

3.4 *Celtis iguanaea*

Celtis iguanaea pertence à família das Ulmáceas, é uma planta espinhenta de 6 a 9 metros de altura, dotada de copa arredondada, quando jovem com os ramos espetados verticalmente conferindo uma forma piramidal à copa. Tronco ereto e cilíndrico, de 15 a 30 cm de diâmetro, com casca rugosa e íntegra (LORENZI; SOUZA, 1999). Os ramos são compridos (7 metros), muito flexíveis, armados com espinhos estipulares curtos, agudos, solitários e recurvados (PIO, 1931). As folhas são simples, descolores, de bordas lisas na base e serrados no restante, glabras na face superior e espazo-pubescentes na inferior com nervuras salientes de cor amarelada e muito visíveis na face inferior, de 3-7 cm de comprimento por 1,5-4 cm de largura, sobre pecíolo de 4-11 cm, com três pares de nervuras secundárias muito características. Possui estípulas transformadas em espinhos como mostra a Figura 7. Inflorescência em fascículos axilares com muitas flores amarelo-esverdeadas. Fruto drupa esférica, glabra, com polpa carnosa e adocicada, contendo uma única semente. Possui ampla distribuição geográfica, ocorre dos Estados Unidos à América do Sul, no Brasil é encontrada nos estados do Acre, Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. A madeira é empregada apenas localmente para estacas, cabo de ferramenta, construções rústicas e para lenha e carvão. Os frutos, Figura 8, são comestíveis e muito procurados por várias espécies de pássaros. A árvore rústica e de rápido crescimento, é indicada para reflorestamento destinado à recuperação da vegetação de áreas ciliares úmidas. É uma planta característica e exclusiva da mata ciliar do vale do rio São Francisco e do Pantanal Matogrossense, onde é comum e com dispersão mais ou menos contínua e regular na área inundável ao longo do rio. Ocorre preferencialmente em capoeiras e áreas abertas da várzea inundável, onde o solo é rico em matéria orgânica e bem suprido de umidade. Apresenta a tendência de brotar facilmente após o corte, geralmente produzindo múltiplos troncos. Floresce durante os meses de agosto a outubro, e os frutos amadurecem de fevereiro a março (LORENZI; SOUZA, 1999). Segundo Pio (1931) a casca apresenta bastante tanino, e usada em injeções no tratamento de leucorréias, e seu fruto macerado e fervido é utilizado em casos de disenteria e catarro intestinal.



FONTE: Flora digital do Rio Grande do Sul, 2009.

FIGURA 7 - ESTÍPULAS TRANSFORMADAS EM ESPINHOS DE *Celtis iguanaea*

A espécie é popularmente conhecida como esporão de galo (SILVA; PROENÇA, 2007), grão de galo (PIO, 1931), joá-mirim, jameri (LORENZI; SOUZA, 1999). Relatos populares indicam o uso de suas folhas sob a forma de chá, para o tratamento de várias queixas tais como dores no corpo, reumatismo, dores no peito, asma, cólicas, má digestão e como diurético (PEREIRA *et al.*, 2008). Em levantamento realizado sobre o uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, Goiás, Brasil, por Silva; Proença, (2008) *Celtis iguanaea* teve um CUPc (concordância de uso popular corrigida) de 54 % para o uso em infecções urinárias (folha/raiz - decocção). Através da concordância de uso popular corrigida (CUPc) são apontados os usos mais difundidos e aceitos para uma espécie, pois provavelmente, são utilizados e reconhecidos por muitas pessoas, o que evidencia maior segurança quanto à sua validade. Assim as espécies com CUPc acima de 50 % podem evidenciar um apreciável potencial de uso medicinal. Portanto *Celtis iguanaea* apresenta um alto consenso de informações e, conseqüentemente implica em maior eficácia quanto ao uso (SILVA; PROENÇA, 2008). Uma pesquisa etnobotânica realizada em cidades do Equador aponta o uso das folhas e frutos (infusão) de *Celtis iguanaea* para dores renais e dor hepática (TENE *et al.*, 2007). Na medicina popular do México a infusão das folhas e flores é usada para o controle do diabetes mellitus (GALICIA *et al.*, 2002). Rodrigues, (2007), em pesquisa etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de florestas estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande, MG, aponta o uso popular da casca do caule de *Celtis iguanaea* para febre.

Em estudo realizado para a investigação das ações farmacológicas do extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea*, em modelos de úlcera gástrica induzida por diferentes agentes ulcerogênicos, em camundongos, para confirmar seu uso ou não na medicina popular, Costa *et al.*, (2008), sugerem que a espécie tem princípios ativos gastroprotetores que não reduzem a motilidade intestinal, o que pode justificar o uso popular da planta no tratamento de distúrbios gástricos.

Pereira *et al.*, (2008), investigaram o potencial mutagênico e/ou recombinogênico do extrato aquoso das folhas em células somáticas de *Drosophila melanogaster* pelo Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. A análise microscópica dos pêlos mutantes presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos permitiu demonstrar que o extrato aquoso de *Celtis iguanaea* não foi capaz de induzir eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos nas condições experimentais apresentadas.



FONTE: Flora digital do Rio Grande do Sul, 2009.

FIGURA 8 - FRUTOS DE *Celtis iguanaea*

3.5 Atividades biológicas

Os metabólitos secundários presentes nas plantas frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Havendo um grande interesse, do ponto de vista farmacêutico, devido ao grande número de substâncias farmacologicamente importantes, com diferentes finalidades terapêuticas. As principais classes de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas são: taninos, alcalóides, cumarinas, antraquinonas, flavonóides (SIMÕES *et al.*, 2003).

Entre as atividades biológicas das plantas medicinais, podemos citar as toxicológicas, alelopática, antibacteriana, antioxidante, antiparasitária, analgésica, antiinflamatória, diurética, anticonvulsivante, miorelaxantes e antiespasmódica, entre outras, neste trabalho foram testadas as atividades toxicológicas, alelopática, antibacteriana e antioxidante, comentadas abaixo.

3.5.1 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Compostos bioativos presentes nas plantas medicinais são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos, uma vez que as normas éticas internacionais recomendam o uso criterioso de animais de laboratório e o desenvolvimento de métodos experimentais alternativos (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

Utilizando-se a concentração letal média (CL50) é possível determinar e avaliar a atividade biológica (toxicidade) de um composto ou extrato natural. O bioensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS) se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas (SIQUEIRA *et al.*, 1998). Além disso, os cistos de *Artemia salina* são facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco. Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90. O ensaio foi proposto inicialmente em 1956, por Michael, Thompson e Abramovitz, e posteriormente desenvolvido por

Vanhaecke *et al.*, em 1981, bem como por Sleet e Brendel em 1983, baseando-se na possibilidade de imobilizar náuplios de *Artemia salina* em culturas laboratoriais. A metodologia admite variações. Solis *et al.*, (1993) propõem a realização deste ensaio em microplacas ao invés de tubos e sugerem a utilização do ensaio também na triagem de novos fármacos antiespasmódicos e antimaláricos. Esta metodologia tem sido empregada ainda para detectar toxicidade preliminar de algas marinhas, para realizar triagem de toxinas fúngicas, e para avaliar efeitos de exposição a metais pesados e pesticidas (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

A *Artemia salina* é um crustáceo da classe Anostracea, de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Possui 4 estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie. A simplicidade do bioensaio TAS favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica. Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, antiviral, antimicrobiana, antiparasitária, tripanossomicida, entre outras (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

3.5.2 Alelopatia

A noção de que as plantas têm a capacidade de interferir no desenvolvimento de outras plantas, por meio de substâncias que liberam na atmosfera ou no solo, remonta à Antiguidade, já no século III a.C., o grego Teofrasto, autor de um tratado sobre Botânica conhecido pela versão latina “De Plantis”, recomenda não cultivar a couve junto da videira, pois os “odores” da primeira prejudicam o desenvolvimento da segunda. Mais tarde, no século I a.C., o poeta romano Virgílio refere-se ao efeito da queima que o linho e a papoula dormideira provocam nas culturas instaladas em seguida no mesmo terreno (Sá, 2008).

O termo alelopatia foi citado pela primeira vez, em 1937, pelo alemão Hans Molish em seu trabalho “Der Einfluss einer Pflanze auf die andere - Allelopathie” (A influência de uma planta sobre a outra - Alelopatia). Citada por diversos autores ao longo dos anos e atualmente, definida pela *International Allelopathy Society* como

processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas e microrganismos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos. Com algumas exceções, os agentes alelopáticos também conhecidos como aleloquímicos, são metabólitos secundários derivados da rota acetato ou chiquimato ou da combinação destas. Os compostos alelopáticos identificados pertencem a várias classes como terpenos, alcaloides, compostos fenólicos, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas. Estes compostos estão se revelando como herbicidas naturais, livres dos efeitos prejudiciais dos herbicidas sintéticos (MALHEIROS; PERES, 2001).

Existem mais de 300 metabólitos secundários vegetais e microbiológicos com propriedades alelopáticas. Estas substâncias podem ser exsudadas por várias partes do vegetal como caules e, na sua maioria, folhas e raízes. Os compostos alelopáticos são liberados pelas plantas através da lixiviação dos tecidos, em que as toxinas solúveis em água são lixiviadas da parte aérea e das raízes, e a volatilização de compostos aromáticos das folhas, flores e caules que são absorvidos por outras plantas.

As condições ambientais como temperaturas extremas, deficiências nutricionais e de umidade, incidência de luz, insetos, doenças e os defensivos agrícolas influenciam a produção de aleloquímicos. Essas condições de estresse frequentemente aumentam a produção de metabólitos secundários, aumentando o potencial de interferência alelopática (GOLDFARB; PIMENTEL; PIMENTEL, 2009).

A alelopatia tem sido reconhecida como um importante mecanismo ecológico que influencia a dominância vegetal, a sucessão, a formação de comunidades vegetais e de vegetação clímax, bem como a produtividade e manejo de culturas.

As substâncias alelopáticas são distribuídas em concentrações variadas em diferentes partes da planta e durante seu ciclo de vida (periodicidade). Quando essas substâncias são liberadas em quantidades suficientes causam inibição ou estimulação (dependendo da concentração) da germinação, crescimento e/ou desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microrganismos. Apesar desses resultados, a importância da alelopatia em ecossistemas naturais ainda é controversa. Muitos cientistas questionam que a alelopatia seja um fator significativo na interação planta-planta, pois as evidências sobre tal fenômeno são de difícil obtenção.

É fácil mostrar que os extratos ou os compostos purificados de uma planta podem inibir o crescimento de outra planta em experimentos de laboratório, mas não

tem sido fácil demonstrar que esses compostos estejam presentes no solo em quantidades suficientes para alterar o desenvolvimento de um vegetal. Além desses fatores, as substâncias orgânicas presentes no solo estão, muitas vezes, ligadas a partículas do solo e podem ser rapidamente degradadas por microrganismos (GOLDFARB; PIMENTEL; PIMENTEL, 2009).

Os aleloquímicos, biomoléculas responsáveis pelos efeitos alelopáticos, são produtos naturais que podem ser metabólitos diretos, subprodutos de outros processos metabólicos ou produtos da decomposição de compostos ou biomassa. São frequentemente nocivos para a planta que os produzem se não forem armazenados numa forma não tóxica ou liberados antes de se acumularem internamente até atingirem níveis tóxicos (GOETZE; THOMÉ, 2004).

A alelopatia propõe uma área de pesquisa de grande importância, a qual permite buscar substâncias de origem vegetal, com atividade herbicida para propiciar uma alternativa ecologicamente benigna no cultivo de plantas para a indústria de fitoterápicos (DIAS *et al.*, 2005).

Em estudos de atividade alelopática procura-se determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma planta receptora. O bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição, ou, algumas vezes, a estimulação da germinação e do crescimento de sementes de espécies silvestres ou de culturas, visto que são ensaios simples, rápidos e requerem pequenos volumes de solução (MALHEIROS; PERES, 2001).

3.5.3 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas continuam a ocupar posição de destaque como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, apesar dos avanços técnico-científicos. Um dos principais fatores que explicam essa liderança é a capacidade que os microrganismos possuem para a aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Tal habilidade impõe a necessidade permanente de pesquisas e o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos microrganismos (AYRES *et al.*, 2008). Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizados como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistosomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES, *et*

al., 2000). Novas fontes de substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas (COSTA *et al.*, 2005).

Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos. A maioria dessas propriedades é conferida por produtos do metabolismo secundário, como terpenoides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade.

Trabalhos recentes sobre a atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais mostram o grande potencial de aplicação de plantas nativas de diversas regiões do mundo. Extratos e óleos de várias espécies mostraram-se eficientes no controle de fungos relacionados a infecções da pele, sobre bactérias patogênicas bucais, e sobre uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. No Brasil, estudos com a mesma finalidade são de grande importância, uma vez que plantas medicinais são utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento. Além disso, nosso país apresenta uma rica biodiversidade, devendo-se considerar o custo mais baixo destas formas terapêuticas em relação a medicamentos industrializados (DUARTE *et al.*, 2004).

Diversos estudos para avaliação da atividade antimicrobiana de várias espécies de plantas já foram realizados. Lentz *et al.*, (1998) estudaram a atividade antimicrobiana das espécies *Buddleia americana*, *Strychnos* e *Spigelia humboldtiana*, todas da família Loganiaceae, e utilizadas pela população como plantas medicinais, e encontraram atividade contra alguns microrganismos como *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Um estudo etnobotânico realizado por Holtez *et al.*; (2002) com 13 plantas medicinais utilizadas pela população brasileira revelou importante atividade antimicrobiana das mesmas, que foram justificadas pela presença de flavonoides e taninos; entre as espécies estudadas as que apresentaram atividade foram: *Piper regnellii*, que mostrou excelente atividade sobre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e moderada sobre *Pseudomonas aeruginosa*; *Punica granatum*, *Psidium guajava*, *Mikania glomerata*, *Arctium lappa*, e *Eugenia uniflora* mostraram-se ativas sobre alguns dos microrganismos testados, entretanto *Psidium guajava*, foi a mais ativa contra o fungo *Cândida albicans*, *Cândida krusei*, *Cândida tropicalis* e *Cândida parapsilosis*.

3.5.4 Atividade antioxidante

Os radicais livres são compostos que possuem na estrutura química um ou mais elétrons desemparelhados, sendo desta forma muito instáveis, altamente reativos, e de meia vida curta. A geração destes radicais livres pode ser endógena (fosforilação oxidativa) ou exógena (radiação, fumo, substâncias tóxicas, como solventes, herbicidas e drogas) (SANTOS, 2006).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, e podem ser classificados em primários, que atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes encontramos os compostos fenólicos, o tocoferol, os aminoácidos, os carotenoides e os antioxidantes sintéticos. A maioria dos flavonoides tem a capacidade de reagir com radicais livres e exercer funções antioxidantes no organismo. Os antioxidantes podem também ser classificados como secundários, atuando no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos e convertendo-os na forma inativa por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia por meio da captação de intermediários reativos como os radicais peroxila e alcooxila. Nesta classe estão os antioxidantes sintéticos, as vitaminas A, C e E, e também os compostos fenólicos (PIETTA, 2000).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial. O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (ASOLINI *et al.*, 2006).

Apesar do uso terapêutico das plantas ser tão antigo quanto à própria espécie humana, o conhecimento das propriedades antioxidantes é relativamente recente, apresentando um enorme crescimento da investigação científica nas duas últimas décadas, envolvendo desde o efeito dos extratos brutos, de frações ou de componentes isolados e/ou modificados. Os antioxidantes presentes nos alimentos são de natureza muito variada, vitaminas, polifenóis, carotenoides e os flavonoides, sendo

que este último constitui o grupo mais representativo encontrado com elevada diversidade de formas (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).

A atividade antioxidante é muito usada como parâmetro (junto com outros) para caracterizar materiais derivados das plantas como frutas, vegetais, vinhos, chás, óleos etc. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra reações potencialmente nocivas que causam excessiva oxidação, impedindo que radicais livres danifiquem células e tecidos.

A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, aplicados atualmente tem como base a formação de radicais livres, os quais são capturados, ao ser adicionado o composto antioxidante, ou por inibir a formação de radicais livres, ou então do consumo de oxigênio por esta e/ou a formação de produtos de oxidação. Muitos métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. E um dos mais utilizados é o do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) que consiste em avaliar a atividade sequestradora deste radical livre estável, que é de coloração púrpura e absorve a 515 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, reação essa monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Outro método utilizado é o do fosfomolibdênio que se baseia na redução do Mo (VI) para Mo (V), com formação de um complexo fosfato/Mo(V) em pH ácido com coloração verde e absorção máxima em 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Os métodos utilizados neste trabalho foram o do DPPH e o do fosfomolibdênio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas da espécie *Celtis iguanaea* utilizada neste trabalho foram coletadas no mês de outubro de 2008, no bairro Campo Comprido, próximo a Igreja Nossa Senhora de Lourdes no município de Curitiba, no estado do Paraná.

Uma exsicata da espécie com frutos foi preparada e enviada ao Museu Botânico Municipal de Curitiba, para identificação botânica, sendo essa realizada por comparação a uma amostra depositada no Museu sob o número de registro MBM 208762.

Após coleta o material foi inspecionado para retirada de material orgânico estranho, as cascas foram então fragmentadas e secas a sombra em temperatura ambiente, sendo moídas em moinho de facas e martelos, em seguida armazenado em recipiente apropriado ao abrigo da luz e umidade.

4.2 FASES NO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Na Figura 9 está demonstrado o fluxograma seguido para o desenvolvimento das atividades desenvolvidas no decorrer da execução deste trabalho.

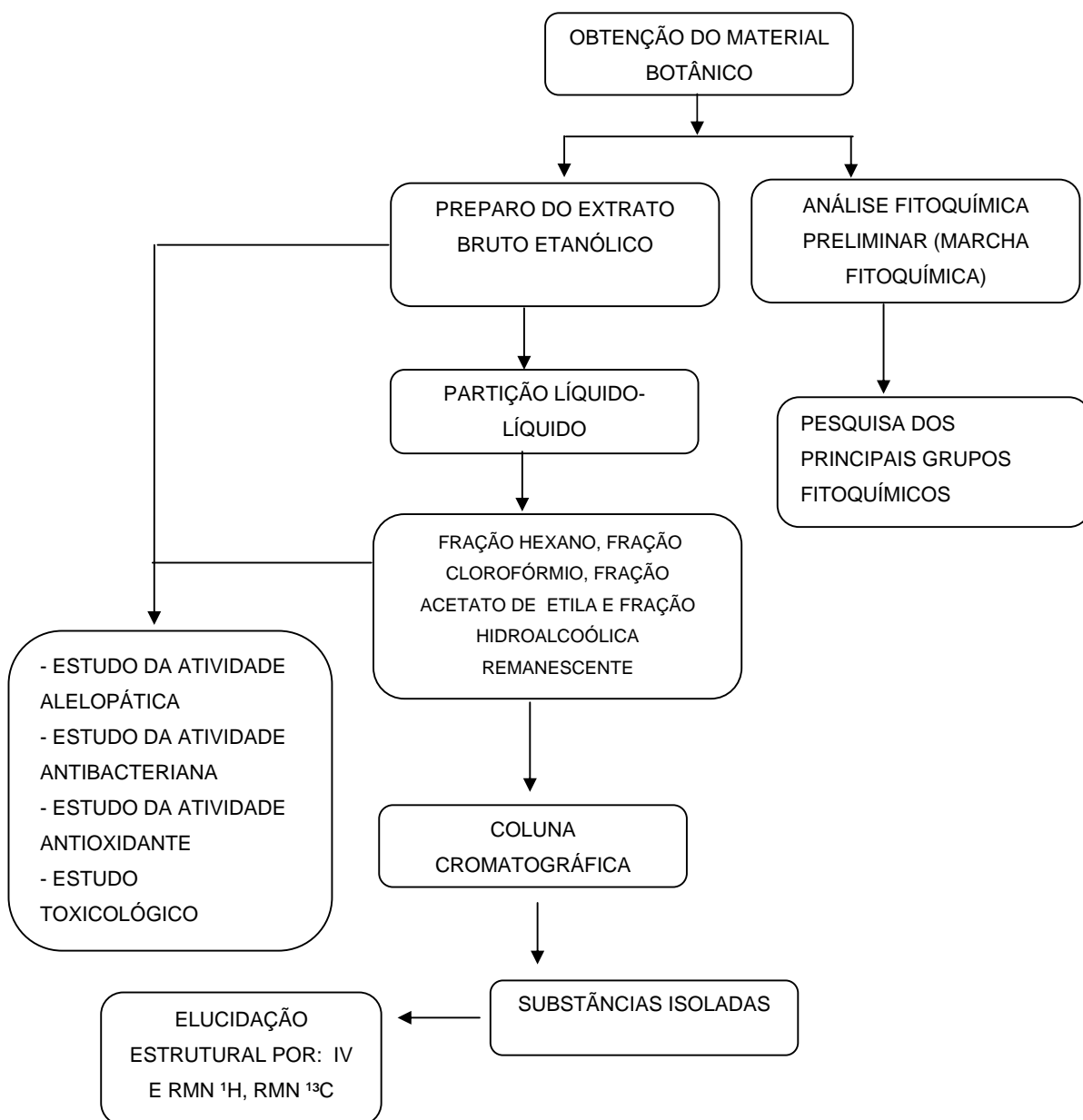


FIGURA 9 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.2.1 Ensaio sistemático para análise fitoquímica das cascas de *Celtis iguanaea*

Para os ensaios fitoquímicos preliminares foi utilizada a marcha sistemática descrita por Moreira (1979) e Miguel (2003) com algumas adaptações. Essa análise fitoquímica preliminar é realizada para orientação, principalmente em relação ao isolamento de substâncias presentes, já que informa os principais grupos de metabólitos secundários presentes nas cascas da espécie *Celtis iguanaea*. Para esse ensaio preliminar foram preparados os extratos alcoólico e aquoso.

4.2.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico

Foram pesados 40 gramas do vegetal moído, e macerado em 200 mL de álcool etílico a 70% v/v, em banho-maria a 60° C por 2 h. Após foi filtrado em papel de filtro e completado o seu volume lavando o material com o líquido extrator até 200 mL.

4.2.1.1.1 Fracionamento do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi concentrado até adquirir 1/3 do seu volume para eliminar o excesso de álcool etílico. Foi realizado o fracionamento sequencial com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Em funil de separação adicionou-se 10 mL do extrato concentrado e 50 mL do respectivo solvente agitou-se bem, este processo foi repetido por quatro vezes, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a hidroalcoólica remanescente, que foram completadas com 200 mL dos respectivos solventes e acondicionadas em frasco âmbar. Com essas frações foram realizadas as pesquisas de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos.

4.2.1.1.2 Pesquisa de alcaloides

Levou-se à secura 50 mL das frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico obtidas em banho-maria a 70° C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de álcool etílico e acrescido de 20 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1%. Foi transferido 2 mL do extrato clorídrico para cinco tubos de ensaio e procedeu-se à pesquisa de alcaloides adicionando 2 gotas dos seguintes reativos: reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de

potássio), reativo de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio), reativo de Bouchardat e reativo de Bertrand (ácido sílico túngstico). Observou-se se houve a formação de precipitado branco ou leve turvação branca para os reativos de Mayer e de Bertrand, precipitado de cor tijolo para o reativo de Dragendorff e precipitado de cor laranja para o reativo de Bouchardat. Em caso de reação positiva, o restante do extrato clorídrico seria transferido para um funil de separação e alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 9 a 10, procedendo-se a extração com 15 mL de uma solução de diclorometano e éter na proporção de 3:1 por três vezes (três extrações de 15 mL). Os extratos orgânicos seriam reunidos, e levados à secura em banho-maria e adicionado 0,5 mL de álcool etílico e 5 mL de HCl a 1%. A reunião seria ligeiramente aquecida e após resfriada, seria dividida em cinco tubos de ensaio e a pesquisa para alcalóides seria novamente realizada utilizando os mesmos reativos. A reação positiva é a formação de precipitado confirmada pela dissolução do complexo com 2 mL de solução alcoólica de ácido tartárico 5%.

4.2.1.1.3 Pesquisa de flavonoides

4.2.1.1.3.1 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram levados à secura em banho-maria 10 mL das frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico, após foi adicionado 5mL de álcool etílico e cinco gotas de HCl concentrado em cada fração e aquecido à ebulição. A reação positiva é confirmada pela reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina em presença de ácido clorídrico, visualizada pela formação de coloração vermelha.

4.2.1.1.3.2 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

Baseia-se na modificação da estrutura do flavonóide em presença de ácido. Secou-se em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, após resfriamento foi adicionado 5 mL de álcool etílico e o conteúdo transferido para tubos de ensaio. O total de 5 mL da fração hidroalcoólica foi transferido diretamente para tubo de ensaio, sem secura prévia. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio, com os tubos acondicionados em copo de béquer contendo

gelo e em capela foi adicionado HCl fumegante lentamente em quantidade suficiente para a ocorrência da reação (reação exotérmica). A reação é positiva se houver formação de coloração amarela a vermelho, para flavonas, vermelho a vermelho-sangue, para flavonóis e diidroflavonóis, vermelho a violeta para flavononas, vermelho a rosa para derivados antociânicos, as chalconas, auronas, di-hidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

4.2.1.1.3.3 Pesquisa de flavonóis

A presença de flavonóis foi verificada por meio do teste do oxalo-bórico ou reação de Taubock. Foi transferido para cápsulas de porcelana 10 mL da fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, e levado a secar em banho-maria. Ao resíduo adicionou-se 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura na proporção 1:1 de ácido bórico e ácido oxálico. Após agitação foi levado à secar e adicionou-se 5 mL de éter etílico, transferiu-se o conteúdo para tubos de ensaio que foram visualizados sob lâmpada ultravioleta, a fluorescência indica reação positiva especialmente para flavonóis. As flavanonas e isoflavonas não têm esta propriedade e os derivados antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência. Esta reação é explicada pela formação de quelatos, produzindo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados do ácido bórico (compostos obtidos do ácido bórico com substituições na molécula por dois radicais orgânicos).

4.2.1.1.3.4 Pesquisa de diidroflavonoides

A pesquisa de diidroflavonoides foi realizada pelo Ensaio de Pacheco. Em cápsula de porcelana foi transferido 10 mL de cada fração, levou-se a secar em banho-maria. O resíduo foi aquecido em fogareiro e adicionado alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético, logo em seguida 0,1 mL de HCl concentrado. O desenvolvimento de uma coloração roxa indica reação positiva para diidroflavonóis, flavonas, as chalconas, auronas, flavonóis e flavononas dão resposta negativa.

4.2.1.1.3.5 Pesquisa de diidroflavonóis

Foram levados a secar em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, após resfriamento foram adicionados 5 mL de álcool etílico e o conteúdo transferido para tubos de ensaio. As frações foram acrescentada uma pastilha de zinco e HCl fumegante (lentamente), mantendo o recipiente em banho de gelo (reação exotérmica) e dentro da capela. A reação positiva é observada com o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.2.1.1.4 Pesquisa de cumarinas

Em copo de béquer foram adicionados 30 mL de cada fração, acidificou-se até pH 1 com HCl 2 mol/L, o volume foi concentrado em banho-maria até 5 mL. Após resfriamento passou-se para um funil de separação e procedeu-se a extração com éter etílico (2 vezes de 10 mL), concentrou-se novamente em banho-maria até 5 mL. Do extrato etéreo, foram transferidos 3 mL para tubo de ensaio e adicionado 2 mL de hidróxido de sódio solução 1 mol/L recém preparada. Os tubos de ensaio foram levados para uma câmara ultravioleta a 366 nm por 15 minutos. A reação positiva é a fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada.

O restante do extrato etéreo (2 mL) foi depositado em papel de filtro em três pontos previamente marcados com grafite de modo a obter três manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Essas manchas foram tratadas com uma gota de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L recém preparada. A mancha 1 foi coberta com uma moeda ou papel alumínio foi levado o papel de filtro a câmara de ultravioleta a 366 nm, deixando a exposição por 15 minutos em caso de reação positiva a mancha 2 (tratada e não coberta) apresenta fluorescência de coloração azul ou verde amarelada. A pesquisa baseia-se no fato de que a dissolução das cumarinas em álcali com clivagem do anel pirrólico forma o ácido *o*-hidroxi cinâmico ou sais de seu ânion. O sal alcalino do ácido hidroxi cinâmico exibe fluorescência. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida para soluções recém preparadas ou soluções estocadas no escuro por meses; no entanto, ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos.

4.2.1.1.5 Pesquisa de antraquinonas

Em balão de fundo chato de 250 mL de capacidade foi transferido 30 mL de cada fração, e adicionado 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. Acoplado em um condensador foi levado a refluxo por 30 minutos, em seguida filtrado ainda quente por papel de filtro. Ao filtrado adicionou-se 30 mL de água destilada, transferiu-se para um funil de separação e separou-se a fração orgânica das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, extrair com éter etílico (2 vezes de 10 mL). As frações foram concentradas até 5 mL, transferido para um tubo de ensaio, para efetuar a reação de Borntraeger, (adicionar 5 mL de solução de hidróxido de amônio) e agitar lentamente. Reação positiva ocorre o aparecimento de coloração vermelha na solução alcalina devido a ionização das hidroxilas fenólicas indicando a presença de naftoquinonas e/ou antraquinonas.

4.2.1.1.6 Pesquisa de esteroides e triterpenos - reação de Liberman Bouchard

Levou-se a secar 30 mL de cada fração em banho-maria, e com auxílio de bastão de vidro foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio, filtrando em seguida. Pipetou-se o extrato clorofórmico para três tubos de ensaio nos volumes de 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL completando o volume para 2 mL com clorofórmio. Efetuou-se a reação de Liberman Bouchard em capela adicionando lentamente 1,0 mL de anidrido acético e 2,0 mL de ácido sulfúrico. A formação de coloração rósea escura ou azul indica presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. A coloração verde indica presença da função hidroxila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6. Se houver coloração amarela provavelmente existe uma metila no carbono 14.

4.2.1.2 Preparo do extrato aquoso

Foram pesados 40 gramas do vegetal moído, macerado em 200 mL de água destilada, em banho-maria por 1 hora a 70° C, em frasco aberto. Após foi filtrado em papel de filtro e completado o seu volume lavando o material com o líquido extrator até 200 mL. Com este extrato foram realizados os testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos e amino grupos.

4.2.1.2.1 Pesquisa de antocianinas

Do extrato aquoso foram transferidos 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, o primeiro tubo foi acidificado com ácido clorídrico 1% (pH aproximadamente 4), no segundo tubo foi adicionado hidróxido de amônio até pH aproximadamente 10, e o terceiro tubo foi neutralizado (pH 7).

O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violácea em meio neutro, indica reação positiva.

4.2.1.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os tubos da pesquisa de antocianinas foram agitados energeticamente com movimentos succionais por cinco minutos, ficando após, em repouso por trinta minutos. A altura do anel de espuma formado logo após agitação e decorridos trinta minutos, foram medidos. A reação positiva é indicada com desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso.

4.2.1.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Foram adicionados 5 mL de extrato aquoso em um tubo de ensaio com o cuidado de não umedecer suas paredes, e adicionado 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1 mol/Litro. Ao tubo foi suspendida uma tira de papel picro-sódico e levado o conjunto ao aquecimento em banho-maria por trinta minutos a 60° C. Este ensaio baseia-se na reação de formação do isopurpurato de sódio na tira de papel picro-sódico, se houver formação de coloração castanha a avermelhada a reação é positiva. Para o preparo do papel picro-sódico tiras de papel de filtro com 1 cm de largura foram embebidas com solução de ácido pícrico 1%, secas ao abrigo da luz e após, embebidas com solução de carbonato de sódio 10%. As tiras secas são armazenadas em frasco âmbar.

4.2.1.2.4 Pesquisa de taninos

Solução de Cloreto férrico

Adicionou-se três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1 mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração verde indica flavonóides e coloração marrom indica polifenóis.

Solução de gelatina

Transferiu-se respectivamente 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL de extrato aquoso para tubos de ensaio e adicionou-se 2 mL de solução aquosa de gelatina a 2,5%. Desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.

4.2.1.2.5 Pesquisa de aminogrupos

Em cápsula de porcelana e com auxílio de um banho-maria à temperatura de 60° C, o volume de 10 mL de extrato aquoso foi concentrado até 5 mL. Em tira de papel de filtro, foram adicionadas cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, o papel de filtro foi nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura de 95-100° C, durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azulviolácea.

4.2.2 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

4.2.2.1 Obtenção do extrato bruto das cascas de *Celtis iguanaea*

Uma amostra de 3 Kg das cascas secas de *Celtis iguanaea*, foi extraída por aparelho de soxhlet modificado segundo Carvalho (2001), conforme Figura 10. O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 3 L com pérolas de vidro. A este sistema foi adicionado álcool etílico 96 °GL até que metade do balão ficasse preenchida de líquido. Todo esse sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por 6 h. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida para

aproximadamente um quinto do seu volume. Este volume foi filtrado e conservado em geladeira até fracionamento do mesmo.



FIGURA 10 - APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO PARA PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

4.2.2.2 Fracionamento do extrato bruto das cascas de *Celtis iguanaea*

O extrato etanólico bruto foi fracionado, por meio de partição líquido-líquido em aparelho de soxhlet com solventes de ordem de polaridade crescente, iniciando-se pelo fracionamento do extrato bruto em hexano, após em clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se assim quatro frações: fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e o resíduo (fração hidroalcoólica remanescente). O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 150 mL, com pérolas de vidro, conforme Figura 11. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em chapa aquecedora e deixado em refluxo por 4 h. Cada fração foi submetida à evaporação em banho-maria até obtenção do resíduo seco, que foi pesado e armazenado em geladeira, para posterior análise.



FIGURA 11 - APARELHO DE SOXHLET ADAPTADO PARA O PARTICIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

4.2.2.3 Isolamento das substâncias obtidas das cascas de *Celtis iguanaea*

O processo de isolamento de substâncias foi realizado com a fração hexano e clorofórmio, tal procedimento não foi realizado com a fração acetato de etila por falta de material suficiente para análise.

Os resíduos secos das frações hexano e clorofórmio foram dissolvidos em clorofórmio e metanol respectivamente, e incorporados a 2 partes de sílica-gel para cada parte de amostra, sob constante homogeneização, o solvente foi evaporado em banho-maria a 50° C, até formação da pastilha. A sílica-gel usada foi a Sílica-gel 60 - Merck®- Art. 7734 - com tamanho de partícula 0,063-0,2mm, 70-230 mesh ASTM. Essa pastilha foi submetida à cromatografia líquida em coluna de 30 cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 30 g de Sílica-gel 60 (0,063-0,200mm) Merck®. Na coluna foi depositado sílica-gel na proporção de 5 partes em relação a pastilha, separadas por um papel de filtro. A amostra foi então eluída em sistema de solventes com gradiente de polaridade crescente. Iniciou-se com 100 % de hexano num volume de 100 mL, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 100% de acetato de etila. Após iniciou-se outro gradiente de polaridade, 100 % de acetato de etila, com variação de 5 % em 5 % de metanol, a fim de possibilitar a separação de possíveis compostos que não foram separados com o

sistema hexano e acetato de etila. Foram coletadas porções de aproximadamente 15 mL em frascos de vidro. As características dessas porções recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasas de Sílica-gel 60 F254 Merck® as quais foram visualizadas com lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm.

4.2.2.4 Metodologia de identificação das substâncias isoladas

Para identificação, todas as substâncias isoladas foram submetidas às análises de espectroscopia no infravermelho e a RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135°.

Os espectros no infravermelho das substâncias isoladas foram obtidos com amostras preparadas em pastilhas de brometo de potássio anidro (KBr) comprimidas em equipamento Bomem - Hartmann & Braum MB-Serie do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° das substâncias isoladas foram obtidos do equipamento Bruker Topsin 1.3 200 MHz do Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

4.2.3 ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

4.2.3.1 Estudo da atividade alelopática

Para avaliação da atividade alelopática foram utilizados o extrato etanólico bruto e as frações obtidas do extrato, de acordo com o método descrito em PEITZ, 2003. A metodologia utilizada foi a de verificação da ocorrência de efeitos inibitórios ou estimulatórios na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa*, frente às amostras testadas, em diferentes concentrações.

As sementes utilizadas na avaliação da germinação e do crescimento foram de *Lactuca sativa* popularmente conhecida como alface, classe fiscalizada, cultivar Babá de verão, fornecedor Top Seeds, lote 24716, com 97% de germinação detectada por meio de teste padrão de germinação. Esta espécie foi escolhida por ser amplamente citada na literatura e apresentar características apropriadas para os testes: maior sensibilidade aos efeitos alelopáticos das plantas, ser facilmente encontrada, requerer pequeno período para a germinação e para o crescimento, não precisar de foto-

período, possuir umidade e temperatura de germinação e crescimento bem definidas, a radícula da plântula apresentar um eixo único, o que facilita a leitura do crescimento, além do tamanho da semente ser considerado mais uniforme. Além disso, a semente de *Lactuca sativa* é empregada em ensaios por apresentar germinação uniforme, ser pequena, porém com grande superfície de contato, tornando-a bastante sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato do meio (BALESTRIN, 2006). Outras sementes poderiam ser utilizadas para o mesmo tipo de ensaio, como as de tomate, trigo, arroz e sorgo, entre outras, inclusive de ervas daninhas como picão preto.

4.2.3.1.1 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções em concentrações decrescentes de 0,8; 0,4; 0,2 e 0,1 mg/mL do extrato etanólico e das frações secas, utilizando os solventes, etanol e hexano, para dissolver as soluções.

4.2.3.1.2 Preparo do material

As amostras foram embebidas em folhas de papel Whatman número 6 com 1 mL das soluções do extrato bruto e das frações particionadas e colocadas em placa de Petri. Esse conjunto foi submetido à secagem em estufa a 50 °C de temperatura por um período de 24 h.

Após a evaporação do solvente, os papéis de filtro correspondentes a cada diluição foram colocados em caixas Gerbox sob fluxo laminar, Figura 12. As caixas Gerbox foram previamente higienizadas com hipoclorito de sódio e enxaguadas com água. Na sequência foram adicionados 6 mL de água destilada e distribuídas 5 sementes de *Lactuca sativa* em 4 repetições, em cada caixa foram colocadas 20 sementes. Após a semeadura as caixas foram envoltas com papel alumínio para a proteção da luz e colocadas em um germinador Mangelsdorf, marca Biomatic, previamente regulado a uma temperatura de 24°C. Em paralelo houve a germinação de controle do solvente e de água nas mesmas condições do experimento. Todos os ensaios foram realizados com 5 sementes em 4 repetições e em câmara de fluxo laminar, a fim de evitar contaminação pelos microrganismos presentes no ar.

Decorridos 7 dias foram realizadas as leituras em papel milimetrado dos comprimentos da radícula (origina a raiz) e do hipocótilo (origina o caule). Para análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000), e a verificação das diferenças das médias estatisticamente significativas foi realizada por meio do teste de Scott-Knott em nível de 5 % de probabilidade, esse teste foi escolhido por ser claro, objetivo e isento de ambigüidades (presentes na maioria dos testes de comparações múltiplas).



FIGURA 12 - CAIXA GERBOX COM 20 SEMENTES

4.2.3.1.3 Teste de germinação

O ensaio do teste de germinação foi realizado com as mesmas concentrações utilizadas para o teste de crescimento. Em paralelo foi promovida a germinação de sementes nas mesmas condições de temperatura, umidade e quantidade, como controle de solvente e de água.

Diariamente, sempre no mesmo horário, foram verificadas quantas sementes germinaram na presença do extrato e das frações, em comparação ao controle contendo somente água. Desta forma, foi possível avaliar se o extrato inibe ou estimula a germinação das sementes.

Após a sementeira as caixas foram envoltas com papel alumínio para a proteção da luz e colocadas em um germinador Mangelsdorf, marca Biomatic, previamente regulado a uma temperatura de 24°C.

Durante o período de 5 dias consecutivos, foi realizada a leitura da germinação nas respectivas concentrações dos extratos e dos controles. As sementes foram

consideradas germinadas quando se tornou visível a protusão da radícula através do tegumento.

Os resultados foram submetidos à análise de acordo com a germinação do grupo controle.

O índice de velocidade de germinação foi calculado para cada repetição de cada tratamento de acordo com a fórmula descrita abaixo:

$$IVG = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ sementes germinadas}}{1^{\circ} \text{ dia}} + \frac{\text{n}^{\circ} \text{ sementes germinadas}}{2^{\circ} \text{ dia}} + \dots$$

Os índices de velocidade de germinação também foram submetidos ao teste de Scott-Knott.

4.2.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando os métodos de difusão em disco e Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foram utilizadas as culturas puras (ATCC - American Type Culture Collection) de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

4.2.3.2.1 Difusão em disco

O teste de difusão em disco seguiu a metodologia adaptada por ROMEIRO (2001), em que se avalia o resultado da atividade pela formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco impregnado com extrato. O microrganismo em solução padronizada foi inoculado em placa com meio sólido onde foram acondicionados os discos com diferentes concentrações de extrato. O resultado positivo é o diâmetro do halo de inibição em milímetros.

4.2.3.2.1.1 Preparo do inóculo

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) foram repicadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a 35 °C por 24 h.

Uma suspensão de cada bactéria foi preparada em 10 mL de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo número 0,5 da escala Mac Farland (0,5 mL de BaCl₂ a 1% em 9,5 mL de H₂SO₄ a 1%).

Com o auxílio de um Swab estéril as bactérias foram semeadas em toda a superfície das placas de Petri contendo o meio ágar Mueller Hinton.

4.2.3.2.1.2 Teste da atividade antibacteriana

O extrato bruto e as frações foram dissolvidos em etanol, 0,1 g em 8 mL, e 80 µL desta solução foram impregnados em discos de papel de 6 mm de diâmetro estéreis, resultando respectivamente em 1000 µg por disco.

Discos de controle dos solventes foram preparados impregnando 80 µL de etanol. Os discos contendo os extratos, frações e controle de solventes permaneceram em câmara de fluxo laminar até secagem completa dos líquidos, após foram colocados com o auxílio de um pinça estéril nas placas inoculadas com as bactérias. No centro de cada placa foi colocado um disco de cloranfenicol 30 µg como controle positivo de inibição.

Os testes foram realizados em triplicata para cada microrganismo. As placas foram incubadas na estufa a 35 °C por 24 h. Após este período as placas foram retiradas da estufa e os halos de inibição foram medidos.

Foi realizado controle de esterilidade do meio e dos discos de papel. Também foi realizado para cada microrganismo controle dos solventes utilizados.

4.2.3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Esse teste foi realizado apenas para as amostras que apresentaram inibição do crescimento bacteriano no teste de atividade antibacteriana, e o método utilizado foi o descrito em KONEMANN (1993), com algumas adaptações. Neste método as bactérias são adicionadas no meio de cultura líquido, contendo diversas concentrações do extrato.

4.2.3.2.2.1 Preparo do inóculo

As cepas das bactérias foram repicadas em 10 mL de caldo trípico de soja e incubadas a 35 °C por 24 h antes do ensaio. Após as 24 h de incubação, os tubos contendo o caldo e os microrganismos foram comparados com a turbidez do tubo número 0,5 da escala Mac Farland. Do caldo contendo os microrganismos foram retirados 2 mL e colocados em 100 mL de solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada.

4.2.3.2.2.2 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas conforme descrito no teste de difusão em disco. As soluções foram adicionadas em tubos de ensaio contendo o caldo trípico de soja, nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64.

4.2.3.2.2.3 Teste da concentração inibitória mínima (CIM)

No meio de cultura contendo as amostras foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana. Para o controle positivo foi utilizado 1 mL de suspensão de bactérias e 1 mL de caldo, e para o controle negativo um tubo com extrato diluído em caldo trípico de soja, na concentração de 1:2, sem a inoculação de microrganismos. Os tubos foram inoculados a 35 °C por 24 h e o teste realizado em triplicata.

Após 24 h foi feita a leitura, comparando-se cada tubo com o controle negativo. A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração da amostra que não houve o crescimento microbiano.

4.2.3.3 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MEYER *et al.*, (1982) adaptada às condições encontradas no laboratório, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos contendo água artificial do mar, com três diferentes concentrações dos extratos e frações, e após 24 h foi realizada a contagem dos animais mortos e vivos. A toxicidade sobre *Artemia salina*, foi determinada através da concentração média letal (LC₅₀) para os microcrustáceos. Foi utilizado sulfato de quinidina como controle positivo de inibição sendo o teste realizado em triplicata.

4.2.3.3.1 Preparo da solução salina

A solução salina foi preparada utilizando 14,31 g de sal marinho (Instant Ocean Sea Salt) em 400 mL de água destilada.

4.2.3.3.2 Eclosão dos ovos

A água do mar artificial foi colocada em um becker de 1000 mL. O pH da água foi verificado e ajustado para 8 a 9 com carbonato de sódio. Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/ 400 mL) foram adicionados na água e mantidos sob agitação e aeração constantes por um período de 48 h para a eclosão dos ovos. Na primeira hora do processo foi mantida a iluminação de 20 W sobre o becker. No período de 48 h a temperatura foi controlada de 26 a 30 °C e o pH verificado e ajustado para 8 a 9.

4.2.3.3.3 Preparo das amostras

Foram utilizados no ensaio o extrato bruto e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração remanescente. Os solventes utilizados foram hexano para a fração hexano, e etanol para as frações clorofórmio, acetato de etila, fração remanescente e extrato bruto. Foram preparadas soluções nas concentrações de 10 mg/mL e de 1 mg/mL. Foram pipetados para os tubos 250 e 25 µL da solução de 10 mg/mL e 25 µL da solução de 1 mg/mL, correspondendo as concentrações de 1000, 100 e 10 µg/mL para um volume final de 2,5 mL. Foram adicionados em três tubos 250 µL do solvente nos quais foi preparada a diluição de cada fração como controle negativo. Soluções de sulfato de quinidina de 10 e 1 µg/mL preparadas em etanol

foram utilizadas como controle positivo. Os tubos foram colocados em estufa a 50 °C por 24 h para eliminação do solvente.

4.2.3.3.4 Avaliação da toxicidade

Decorridas 24 h, os ovos foram eclodidos e 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidos em cada tubo. O volume de todos os tubos foi ajustado para 2,5 mL com água do mar artificial. Também foi realizado um controle negativo com água do mar artificial. Após 24 h foi realizada a contagem de náuplios mortos e vivos.

Os dados foram analisados pelo método estatístico Probitos, pelo qual foram determinados os valores de LC50 e 95% de intervalo de confiança. Resultados de LC50% menores que 1000 µg/mL indicam atividade.

4.2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através dos métodos de formação do complexo fosfomolibdênio e redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

4.2.3.4.1 Formação do Complexo fosfomolibdênio

Este método, descrito por PRIETO (1999). Foi preparada uma solução de 0,2 mg/mL do extrato bruto e frações e retirado uma alíquota de 0,3 ml para um tubo de ensaio, e adicionado 1 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio e 1,5 mL de água destilada. Os tubos foram incubados por 90 minutos a 95° C e depois resfriados até temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado em triplicata. As absorbâncias das amostras foram lidas no comprimento de onda 695 nm, utilizando água como branco. As mesmas diluições foram usadas para os padrões vitamina C (0,2 mg/mL) e rutina (0,2 mg/mL). Ambos foram submetidos aos mesmos procedimentos das amostras. A capacidade antioxidante da amostra foi expressa em relação à vitamina C e a rutina, considerando-se a absorbância da vitamina C correspondente a 100% de atividade antioxidante.

4.2.3.4.2 Redução do Radical DPPH

Foi calculado o intervalo da curva de absorbância em relação à concentração para cada amostra e padrão:

Para o ácido ascórbico foram preparadas 6 diluições entre 10 e 1 µg/mL, para a rutina foram preparadas 5 diluições entre 10 e 1,25 µg/mL, e para o extrato bruto foram preparadas 6 diluições entre 50 e 350 µg/mL, para a fração hexano foram preparada 6 diluições entre 100 e 400 µg/mL, para a fração clorofórmio foram preparadas 6 diluições entre 50 e 250 µg/mL, para a fração acetato de etila foram preparadas 6 diluições entre 15 e 125 µg/mL, e para a fração remanescente foram preparadas 6 diluições entre 50 e 600 µg/mL.

A 2,5 mL de cada uma das diluições obtidas foi adicionado 1 mL DPPH 0,3 mmoles/L. Para cada diluição foi feito um branco, composto da mistura de 2,5 mL de cada diluição com 1 mL de etanol. As reações foram realizadas em triplicata. Foi preparado um controle utilizando 2,5 mL de etanol e 1 mL de solução de DPPH 0,3 mmoles/L, para o extrato bruto, e as frações clorofórmio, acetato de etila; para a fração hexano foi utilizado hexano no lugar de etanol e para a remanescente água. As absorbâncias das amostras foram lidas no comprimento de onda 518 nm, após 30 minutos, a 25 ° C.

Para cada concentração foi determinada a IC% (porcentagem de atividade antioxidante) por meio da equação descrita abaixo:

$$IC\% = 100 - [Abs amostra - Abs branco / Abs controle] \times 100$$

Com os resultados do IC% de cada concentração, foi feito um gráfico para cada uma das amostras analisadas (extrato bruto, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, remanescente, ácido ascórbico e rutina), no eixo das abcissas foi posto a concentração em µg/mL e na ordenada a IC%, obtendo-se as equações das retas, com as quais, foi determinado a IC₅₀ do extrato bruto e frações, do ácido ascórbico e da rutina. A IC₅₀ é a concentração em µg/mL suficiente para obter 50% do efeito máximo estimado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS SISTEMÁTICOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA DAS FRAÇÕES E EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

Conforme mostra o Quadro 2 a análise sistemática preliminar do extrato hidroalcoólico indicou a presença de leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos e flavonóis nas frações acetato de etila e clorofórmio; e diidroflavonóis e cumarina na fração acetato de etila; e esteróides/triterpenos no extrato hidroalcoólico e na fração hexano. O Quadro 3 mostra o resultado da análise do extrato aquoso que indicou a presença de taninos e aminogrupos na espécie.

QUADRO 2 - ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Celtis iguanaea*

Grupo fitoquímico	Reação	Extrato hidroalcoólico	Fração hexano	Fração Acetato de etila	Fração Clorofórmio
Alcaloides	Reativo Mayer	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Reativo Dragendorff	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Reativo Bouchardat	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Reativo Bertrand	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Flavonoides	Leucoantocianidinas	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	Heterosídeos Flavônicos	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	Flavonóis	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	Diidroflavonoides	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Diidroflavonóis	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Cumarina	Tubo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Papel	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Antraquinonas		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Esteróides/ triterpenos		Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

QUADRO 3 - ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Celtis iguanaea*

Grupo fitoquímico	Resultado		
Antocianinas	pH neutro: Negativo		
	pH ácido: Negativo		
	pH básico: Negativo		
Heterosídeos Saponínicos		Altura inicial	Altura 30'
	pH neutro	2,0 cm	0
	pH ácido	1,7 cm	0,9 cm
	pH básico	4,5 cm	1,0 cm
Heterosídeos Cianogênicos	Negativo		
Taninos	Positivo		
Aminogrupos	Positivo		

5.2 PORCENTAGEM DE RESÍDUOS SECOS DAS FRAÇÕES DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

A Tabela 1 relaciona os resíduos secos das frações em relação à quantidade de material vegetal usada na extração. Conforme mostram os resultados a fração que apresentou maior rendimento foi a remanescente 49,6417 g, e a que apresentou menor foi a fração acetato de etila, 0,6726 gramas.

TABELA 1: PESO DOS RESÍDUOS SECOS DAS FRAÇÕES (EM GRAMAS) EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE MATERIAL VEGETAL USADA NA EXTRAÇÃO *Celtis iguanaea*

	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Fração Remanescente
Rendimento em gramas dos resíduos secos das frações, obtidos a partir de 3 Kg do vegetal seco	20,9413	11,1997	0,6726	49,6417

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS NO FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXANO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

Da fração hexano foram coletados 141 frações em frascos de aproximadamente 15 mL cada, que foram reunidas de acordo com semelhanças observadas na análise em CCD. Após evaporação do solvente foi observado cristalizações em vários frascos. Essas amostras foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD). Fase móvel 93 mL :7 mL tolueno:acetato de etila, e a revelação com vanilina sulfúrica mostrou a presença de uma mistura de três compostos em todas as frações analisadas conforme mostra a Figura 13 sugerindo a presença de esteroides e/ou triterpenos.

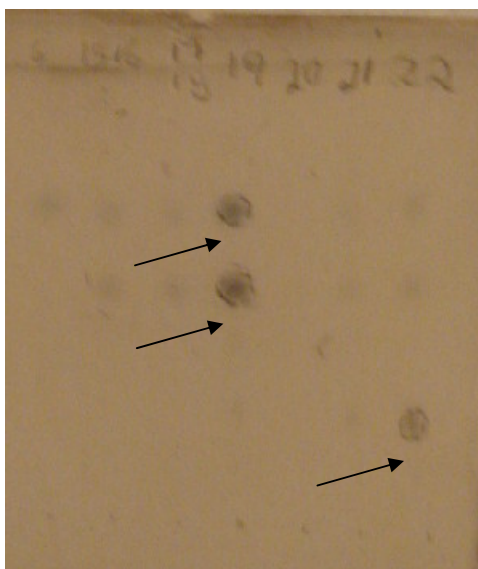


FIGURA 13 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO HEXANO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

A purificação dos compostos foi feita por filtração utilizando os solventes hexano, clorofórmio e metanol, em funil sinterizado G3 à vácuo. Após purificação as substâncias foram identificadas como FH-1 (8,7 mg), FH-2 (9,5 mg) e FH-3 (19,1 mg).

5.3.1 Identificação estrutural da substância FH-1 isolada da fração hexano das cascas de *Celtis iguanaea*

A substância FH-1 foi isolada como um sólido amorfo branco e apresentou os seguintes dados espectroscópicos:

O espectro na região do infravermelho, obtido em KBr, revelou a presença de bandas de absorção condizentes com a presença de grupo carbonílico de cetona em anel de seis membros ($1712,78\text{ cm}^{-1}$) e de grupos metílicos, metilênicos e metínicos respectivamente ($2931,79$, $2870,07$, $1450,47$, $1388,74\text{ cm}^{-1}$) conforme mostra a Figura 14.

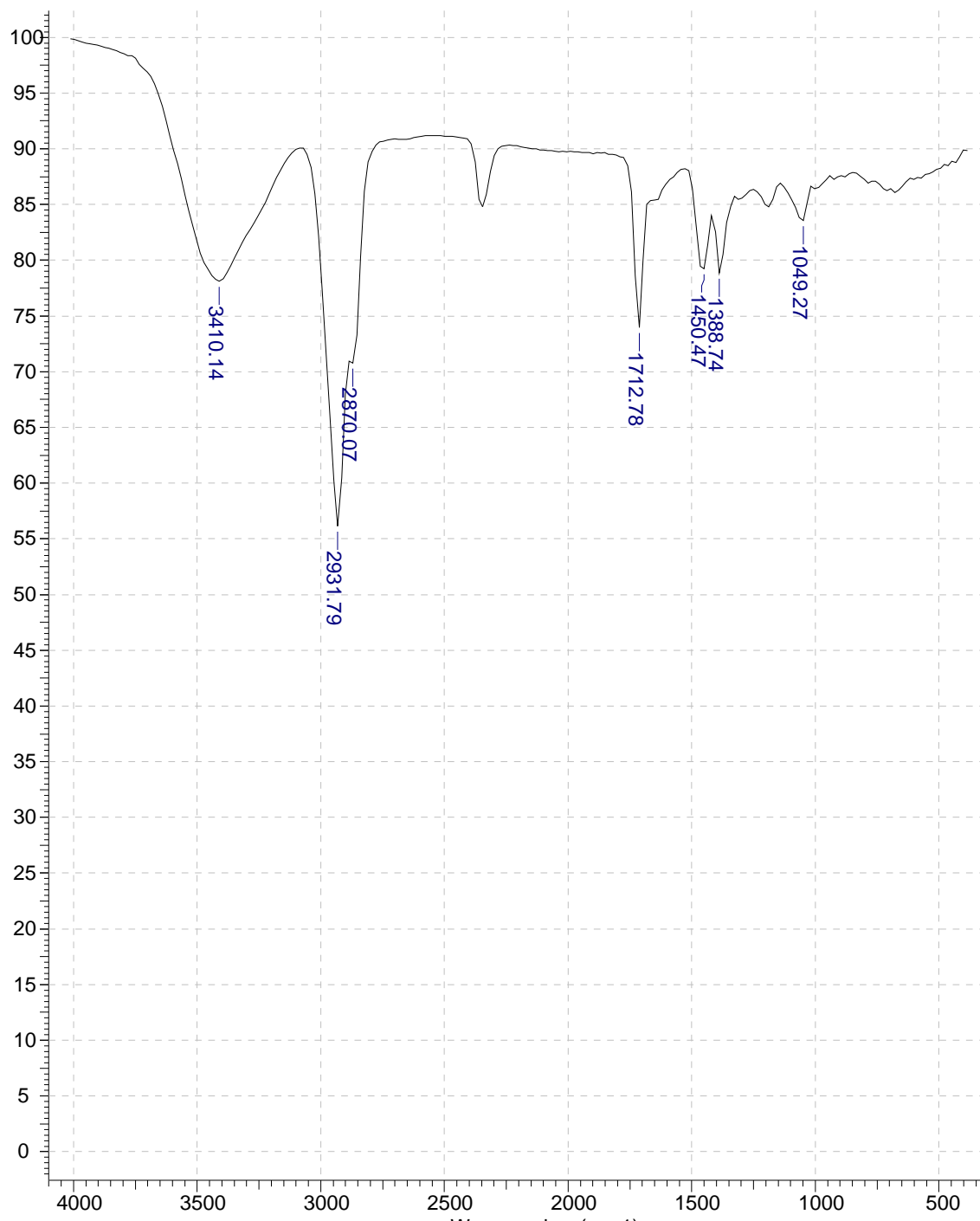


FIGURA 14 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FH-1

O espectro de RMN de ^1H Figuras 15, 16 e 17, apresentou 8 sinais entre 0,75 δ e 1,2 δ indicando a presença de oito grupos metílicos na molécula, sendo que 7 destes sinais apresentaram-se como singletes (0,72 δ ; 0,87 δ ; 0,95 δ ; 1,0 δ ; 1,05 δ ; 1,18 δ ; 1,25 δ), referentes aos hidrogênios dos carbonos C-24, C-25 e C-29, C-30, C-26, C-27, e C-28 respectivamente, outro sinal como dublete (0,89 δ ; J=6,6 Hz), esse atribuído aos hidrogênios da Me-23 (metila secundária). O espectro ainda apresentou um multiplete entre 2,20 a 2,45 δ , indicando a presença de três hidrogênios α -carbonílicos, além de sinais entre 1,25 δ a 1,76 δ , indicando a presença exclusiva de hidrogênio ligado a carbono sp^3 na molécula.

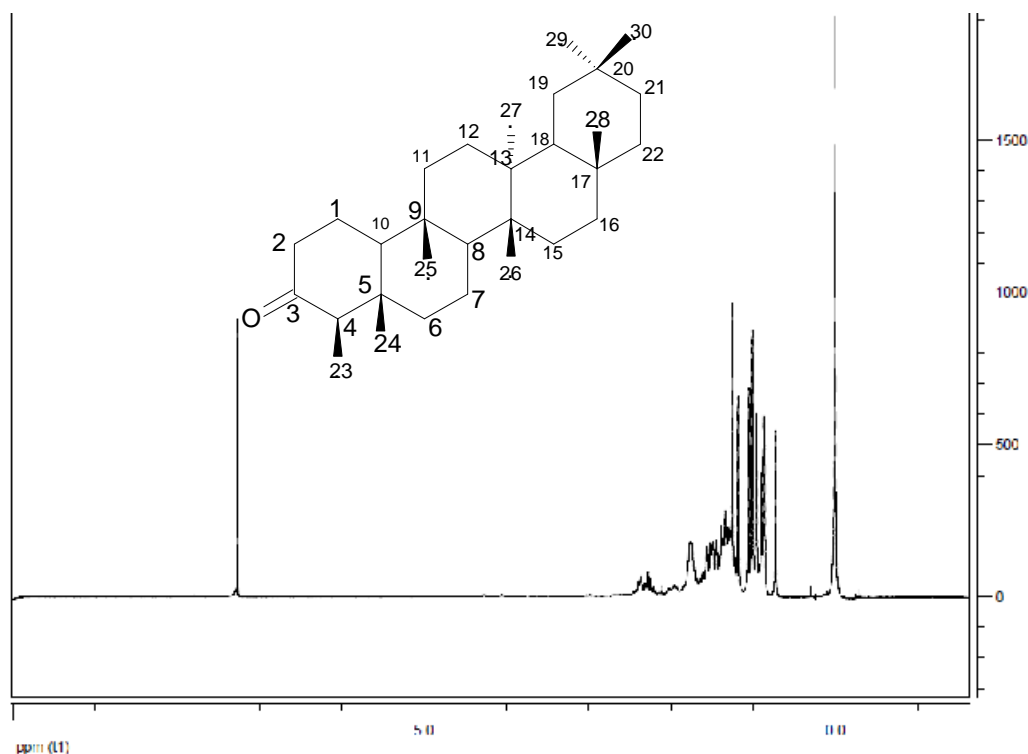
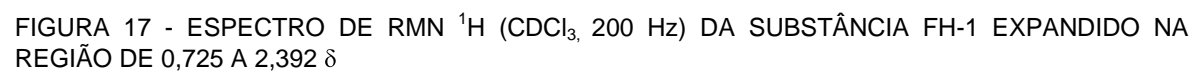
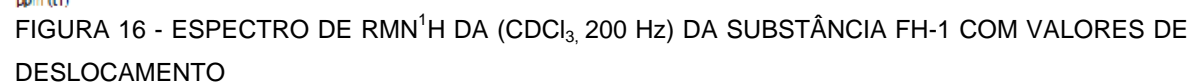


FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1



A análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$ Figuras 18, 19 e 20 permitiram identificar um total de trinta átomos de carbonos concentrados na região abaixo de δ 70 que caracteriza a presença de carbonos sp^3 . Sendo que destes carbonos quatro são terciários (CH), onze secundários (CH_2), oito primários (CH_3) e sete quaternários. Dentre os sinais observados, ressaltam-se os seguintes valores:

Em 213,2 δ (C-3), atribuído a um grupo carbonílico de cetona em anel de seis membros;

Em 6,8 δ indicando a presença de um grupo metílico bastante protegido referente a metila de C-23. Essa proteção foi atribuída ao efeito γ -gauche da carbonila.

Os sinais em 41,5 δ (CH_2), 58,2 δ (CH), 42,1 δ (C), 14,6 δ (CH_3), referentes aos carbonos: C-2, C-4, C-5 e C-24 respectivamente, valores que condizem com a presença de um triterpeno pentacíclico da série friedelano (MAHATO; JUNDI, 1994).

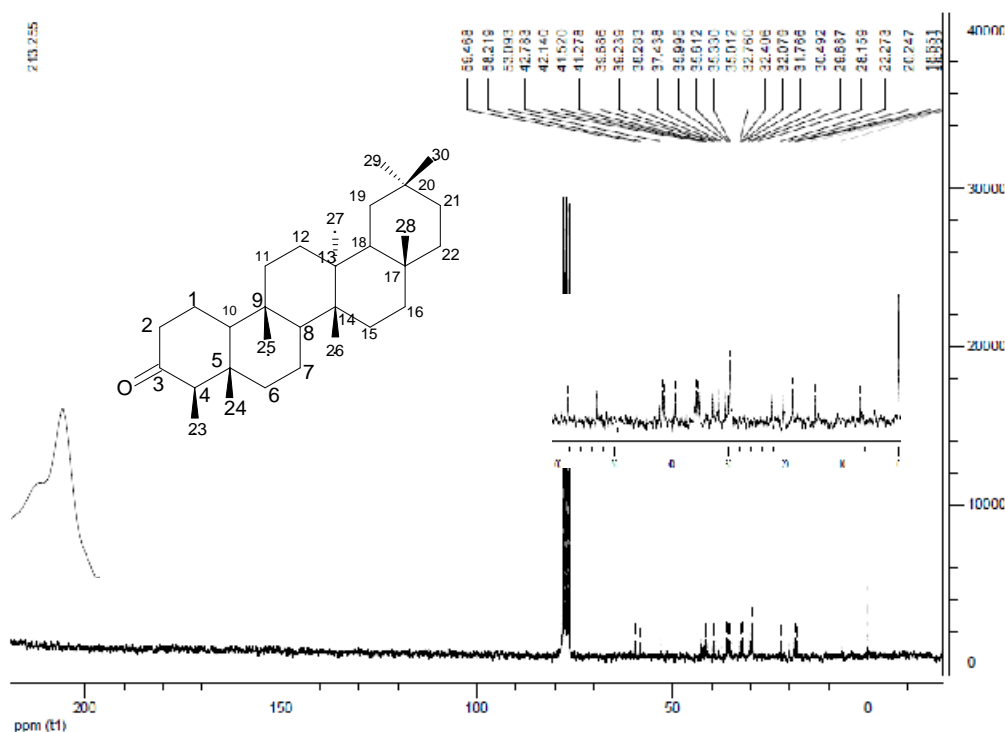


FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1

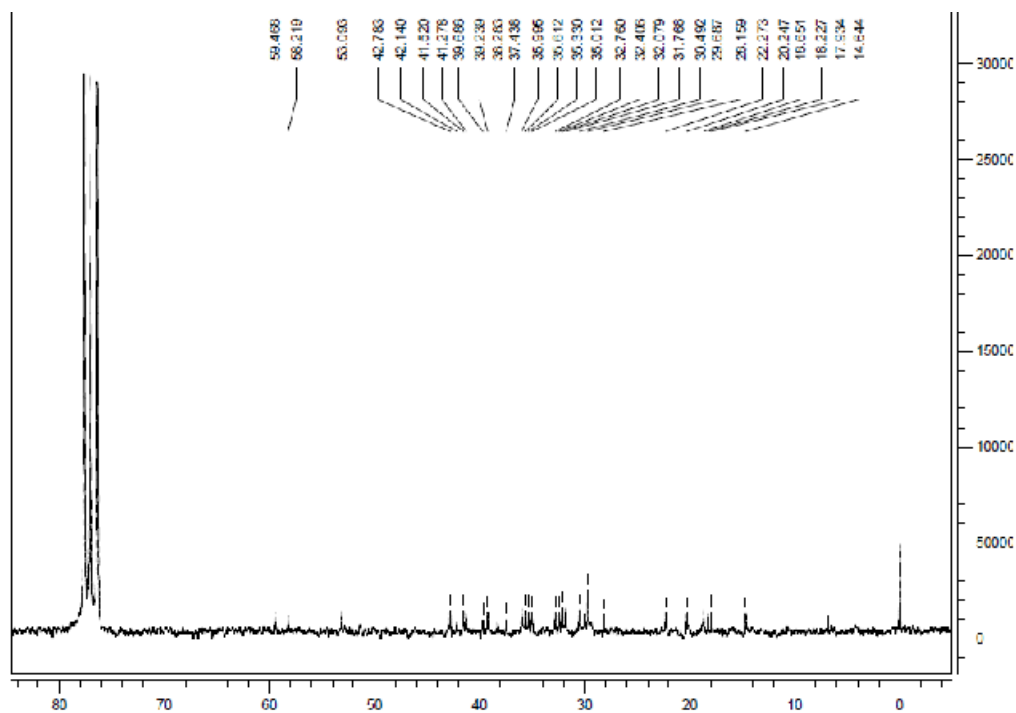


FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-1 EXPANDIDO NA REGIÃO DE 14,67 A 59,47 δ

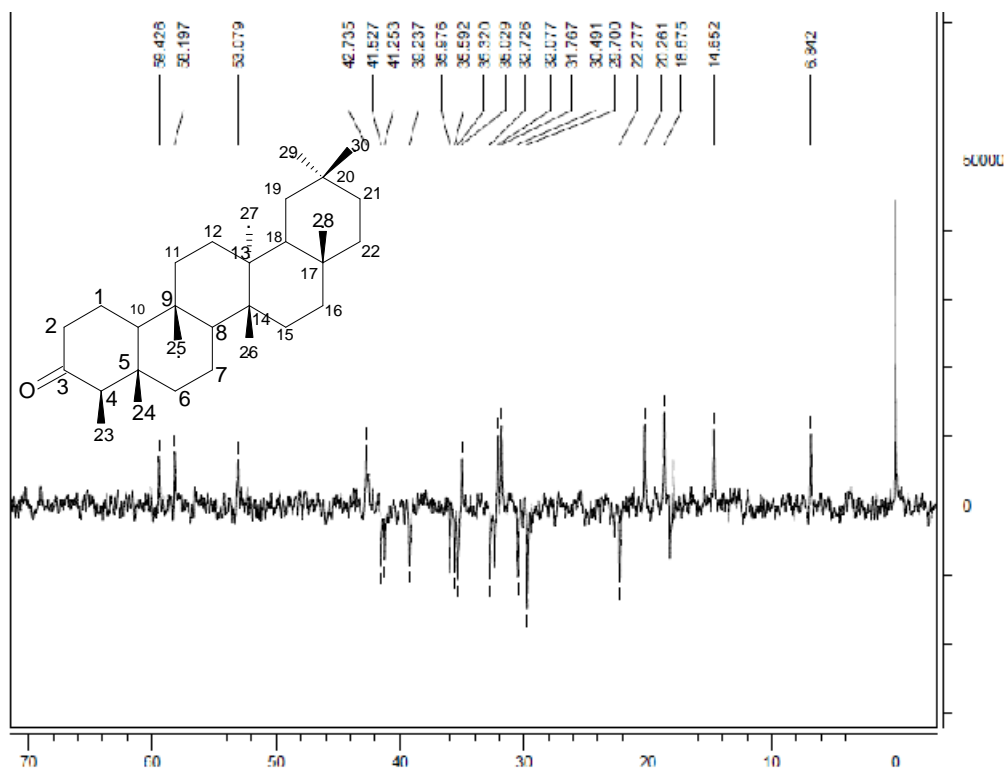


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DEPT 135° SUBSTÂNCIA FH-1 EXPANDIDO NA REGIÃO ENTRE 6,8 A 59,4 δ

Com base nos dados discutidos associados à análise comparativa com a descrita na literatura (ARAGÃO *et al.*, 1990), mostrados na Tabela 2, permitiram propor para a substância FH-1, a estrutura de um triterpeno pentacíclico da série friedelano, conhecido com friedelina.

TABELA 2 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^{13}C /DEPT PARA FH-1 E DADOS DA LITERATURA PARA A FRIEDELINA (ARAGÃO *et al.*, 1990)

C	Friedelina (Literatura)	Substância FH-1
1	22,7 (CH ₂)	22,3 (CH ₂)
2	41,8 (CH ₂)	41,5 (CH ₂)
3	213,0 (C)	213,0 (C)
4	58,2 (CH)	58,2 (CH)
5	42,8 (CH)	42,1 (CH)
6	41,2 (CH ₂)	41,3 (CH ₂)
7	18,3 (CH ₂)	18,6 (CH ₂)
8	53,2 (CH)	53,1 (CH)
9	37,8 (C)	37,4 (C)
10	59,5 (CH)	59,5 (CH)
11	35,2 (CH ₂)	35,0 (CH ₂)
12	32,4 (CH ₂)	32,4 (CH ₂)
13	38,2 (C)	38,3 (C)
14	39,7 (C)	39,2 (C)
15	30,6 (CH ₂)	30,5 (CH ₂)
16	36,1 (CH ₂)	36,0 (CH ₂)
17	30,0 (C)	29,7 (C)
18	42,9 (CH)	42,8 (CH)
19	35,3 (CH ₂)	35,6 (CH ₂)
20	28,2 (C)	28,2 (C)
21	32,9 (CH ₂)	32,8 (CH ₂)
22	39,3 (CH ₂)	39,2 (CH ₂)
23	6,8 (CH ₃)	6,8 (CH ₃)
24	14,1 (CH ₃)	14,6 (CH ₃)
25	18,2 (CH ₃)	17,9 (CH ₃)
26	18,6 (CH ₃)	18,3 (CH ₃)
27	20,1 (CH ₃)	20,2 (CH ₃)
28	32,1 (CH ₃)	32,1 (CH ₃)
29	31,8 (CH ₃)	31,8 (CH ₃)
30	35,0 (CH ₃)	35,3 (CH ₃)

A friedelina Figura 21, já foi isolada anteriormente de algumas espécies da família Ulmaceae, do gênero *Ulmus*, por exemplo, foi isolada das espécies: *U. glabra*, *U. laevis*, *U. minor* e *U. pumila* (BENITO, *et al.*, 2005). Segundo estudos feitos por Shimizu; Tomoo (1994) a friedelina possuem atividade antiinflamatória, reduziu o edema induzido na pata de ratos pela carragenina. De acordo com Singh; Dubey (2001), a friedelina possui atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *S. aureus*, *E. coli*, e também contra o fungo *Aspergillus niger*.

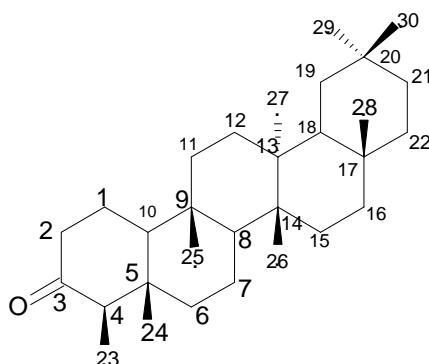


FIGURA 21 - ESTRUTURA DA FRIEDELINA

5.3.2 Identificação estrutural da substância FH-2 isolada da fração hexano das cascas de *Celtis iguanaea*

A substância FH-2 foi isolada como um sólido branco na forma de cristais pontiagudos brilhantes e apresentou os seguintes dados espectroscópicos:

O espectro na região do infravermelho, obtido em KBr, revelou certa similaridade com o espectro da substância FH-1, sendo que os mais relevantes são a banda larga em 3417 cm^{-1} , caracterizando a presença de grupamento hidroxila, os de grupos metílicos, metilênicos e metínicos nas bandas $2931,79$, $2870,07$, $1450,47$, $1388,74\text{ cm}^{-1}$ conforme mostra a Figura 22.

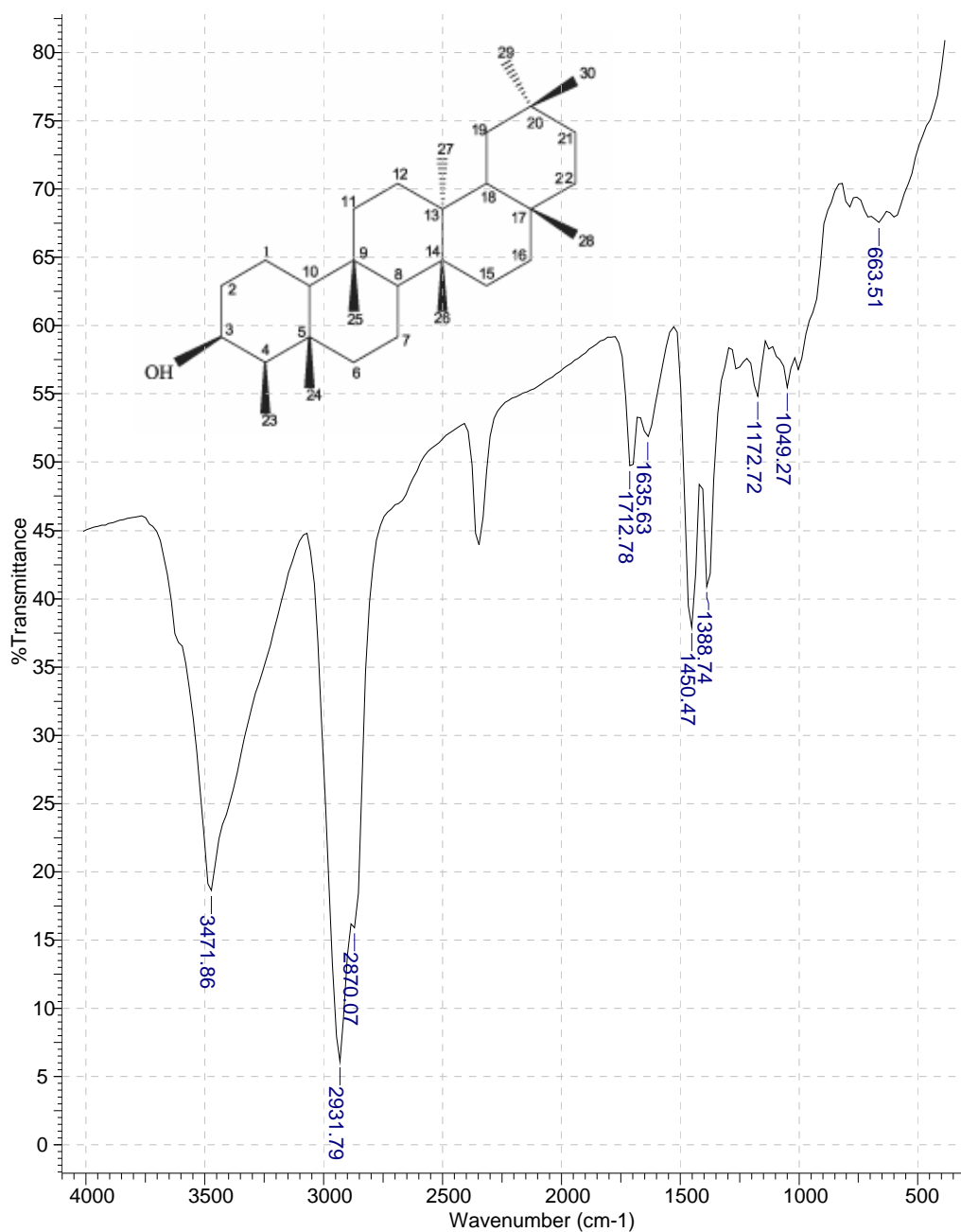
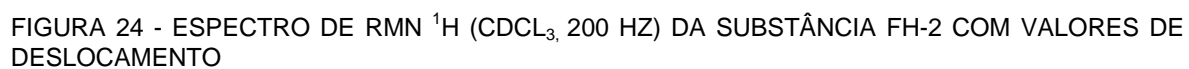
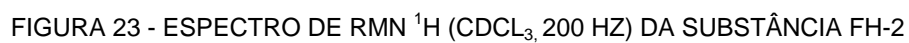


FIGURA 22 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FH-2

O espectro de RMN de ^1H de FH-2, Figuras 23, 24 e 25, mostra também grande similaridade com o da substância FH-1, uma grande quantidade de sinais na região entre 0,80 - 1,10 δ referentes à hidrogênios metílicos 0,93 δ (H-23), 0,95 δ (H-24), 0,89 δ (H-25), 0,99 δ (H-26), 0,98 δ (H-27), 0,99 δ (H-28), 0,92 δ (H-29), 1,20 δ (H-30), com exceção ao sinal em δ 3,73 (d, $J=2,4$ Hz) referente ao hidrogênio carbinólico H-3.



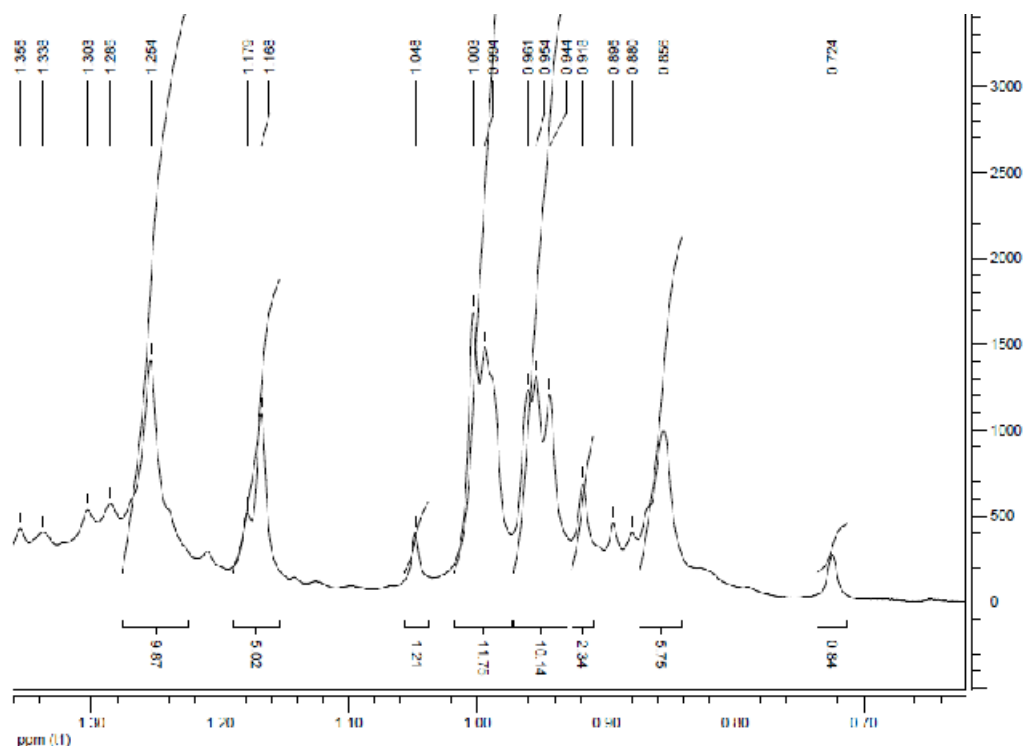


FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 HZ) DA SUBSTÂNCIA FH-2 EXPANDIDO NA REGIÃO DE 0,724 A 1,355 δ

No espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$ Figuras 26 e 27, também foram observados vários pontos de similaridade com a substância FH-1, trinta sinais de átomos de carbonos, sendo 29 concentrados na região abaixo 70 δ , que caracteriza a presença de carbonos sp^3 . Sendo que a diferença com FH-1 reside na ausência da carbonila em 213,0 δ e aparecimento do sinal de um carbono metínico em δ 72,7 atribuído ao carbono carbinólico C-3. Foram observados também quatro sinais de carbonos terciários (CH): 42,8 δ ; 49,1 δ ; 53,2 δ ; 61,3 δ ; referentes aos carbonos: C-18, C-4, C-8, e C-10 respectivamente. Onze de carbonos secundários (CH_2), metilênicos em 15,8 δ ; 35,2 δ ; 41,7 δ ; 17,5 δ ; 35,5 δ ; 32,8 δ ; 30,6 δ ; 36,1 δ ; 35,3 δ ; 32,3 δ ; 39,3 δ ; referentes aos carbonos: C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-12, C-15, C-16, C-19, C-21 e C-22, respectivamente. Oito carbonos primários (CH_3) metílicos em 11,6 δ ; 16,4 δ ; 18,2 δ ; 18,6 δ ; 20,1 δ ; 32,1 δ ; 31,8 δ ; 35,0 δ ; referentes aos carbonos C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 e C-30, respectivamente. E seis carbonos quaternários (C): 41,3 δ ; 37,1 δ ; 38,3 δ ; 39,7 δ ; 29,7 δ ; 28,2 δ , referentes aos carbonos: C-5, C-9, C-13, C-14, C-17 e C-20, respectivamente.

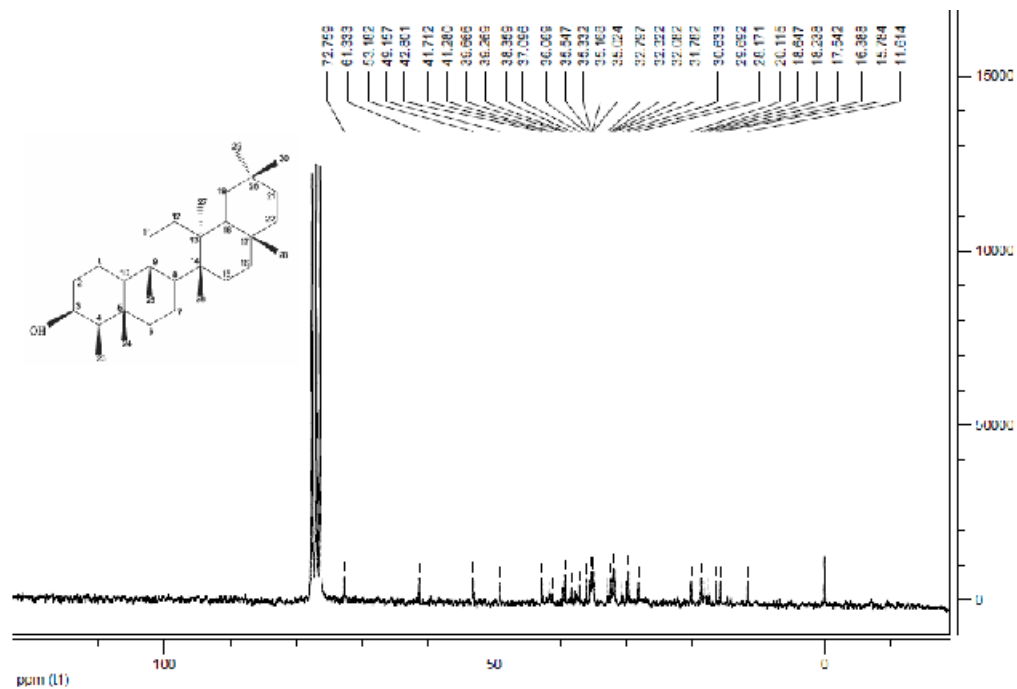


FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-2

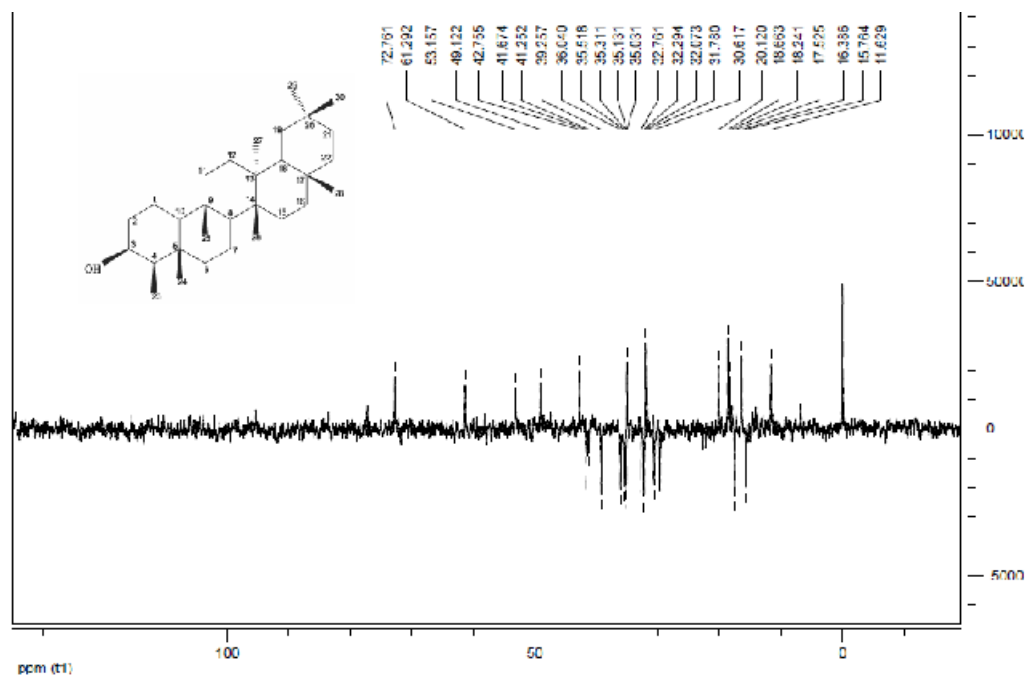


FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FH-2

Com base nos dados discutidos associados à análise comparativa com a descrita na literatura (ARAGÃO *et al.*, 1990), mostrados na Tabela 3, permitiram propor para a substância FH-2, a estrutura de outro triterpeno pentacíclico da série friedelano, conhecido como epifriedelinol.

TABELA 3: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^{13}C /DEPT PARA FH-2 E DADOS DA LITERATURA PARA O EPIFRIEDELINOL ((ARAGÃO *et al.*, 1990)

C	Epifriedelinol (Literatura)	Substância FH-2
1	15,8 (CH ₂)	15,8(CH ₂)
2	35,2 (CH ₂)	35,2 (CH ₂)
3	72,7 (C-OH)	72,8 (C)
4	49,2 (CH)	49,1 (CH)
5	41,2 (CH)	41,3 (CH)
6	41,8 (CH ₂)	41,7 (CH ₂)
7	17,6 (CH ₂)	17,5 (CH ₂)
8	53,2 (CH)	53,2 (CH)
9	37,8 (C)	37,1 (C)
10	61,4 (CH)	61,3 (CH)
11	35,6 (CH ₂)	35,5 (CH ₂)
12	32,9 (CH ₂)	32,8 (CH ₂)
13	38,2 (C)	38,3 (C)
14	39,7 (C)	39,7 (C)
15	30,6 (CH ₂)	30,6 (CH ₂)
16	36,1 (CH ₂)	36,1 (CH ₂)
17	29,3 (C)	29,7 (C)
18	42,9 (CH)	42,8 (CH)
19	35,6 (CH ₂)	35,3 (CH ₂)
20	28,2 (C)	28,2 (C)
21	32,9 (CH ₂)	32,3 (CH ₂)
22	39,3 (CH ₂)	39,3 (CH ₂)
23	11,6 (CH ₃)	11,6 (CH ₃)
24	16,4 (CH ₃)	16,4 (CH ₃)
25	18,2 (CH ₃)	18,2 (CH ₃)
26	18,6 (CH ₃)	18,6 (CH ₃)
27	20,1 (CH ₃)	20,1 (CH ₃)
28	32,1 (CH ₃)	32,1 (CH ₃)
29	31,8 (CH ₃)	31,8 (CH ₃)
30	35,0 (CH ₃)	35,0 (CH ₃)

O epifriedelinol, Figura 28, já foi isolado de algumas espécies da família Ulmaceae, do gênero *Ulmus* foi isolada de *U. glabra*, *U. laevis* e *U. pumila* (BENITO, *et al.*, 2005), do gênero *Celtis*, foi isolado de *Celtis sinensis* (KIM *et al.*, 2005), e Kundu *et al.*, (2000) relatam que o mesmo possui ação antitumoral.

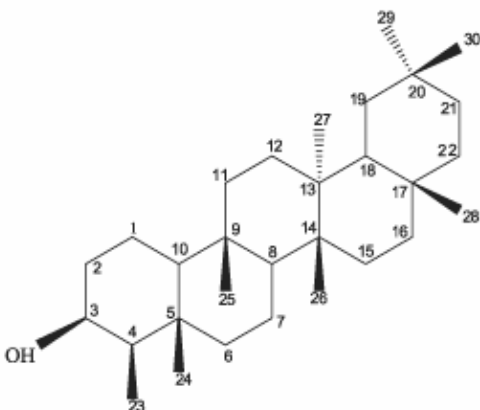


FIGURA 28 - ESTRUTURA DO EPIFRIEDELINOL

5.3.3 Identificação estrutural da substância FH-3 isolada da fração hexano das cascas de *Celtis iguanaea*

A substância FH-3 foi isolada como um sólido em forma de cristais finos brancos e apresentou os seguintes dados espectroscópicos:

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr Figura 29 apresentou um perfil de absorção típico de estruturas esteroidais ou triterpênicas. Uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3441 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O-H; grupos metílicos, metilênicos e metínicos ($2947,22\text{ cm}^{-1}$, $1465,9\text{ cm}^{-1}$, $1373,31\text{ cm}^{-1}$). Além disso, observou-se uma banda em 1651 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação dupla C=C.

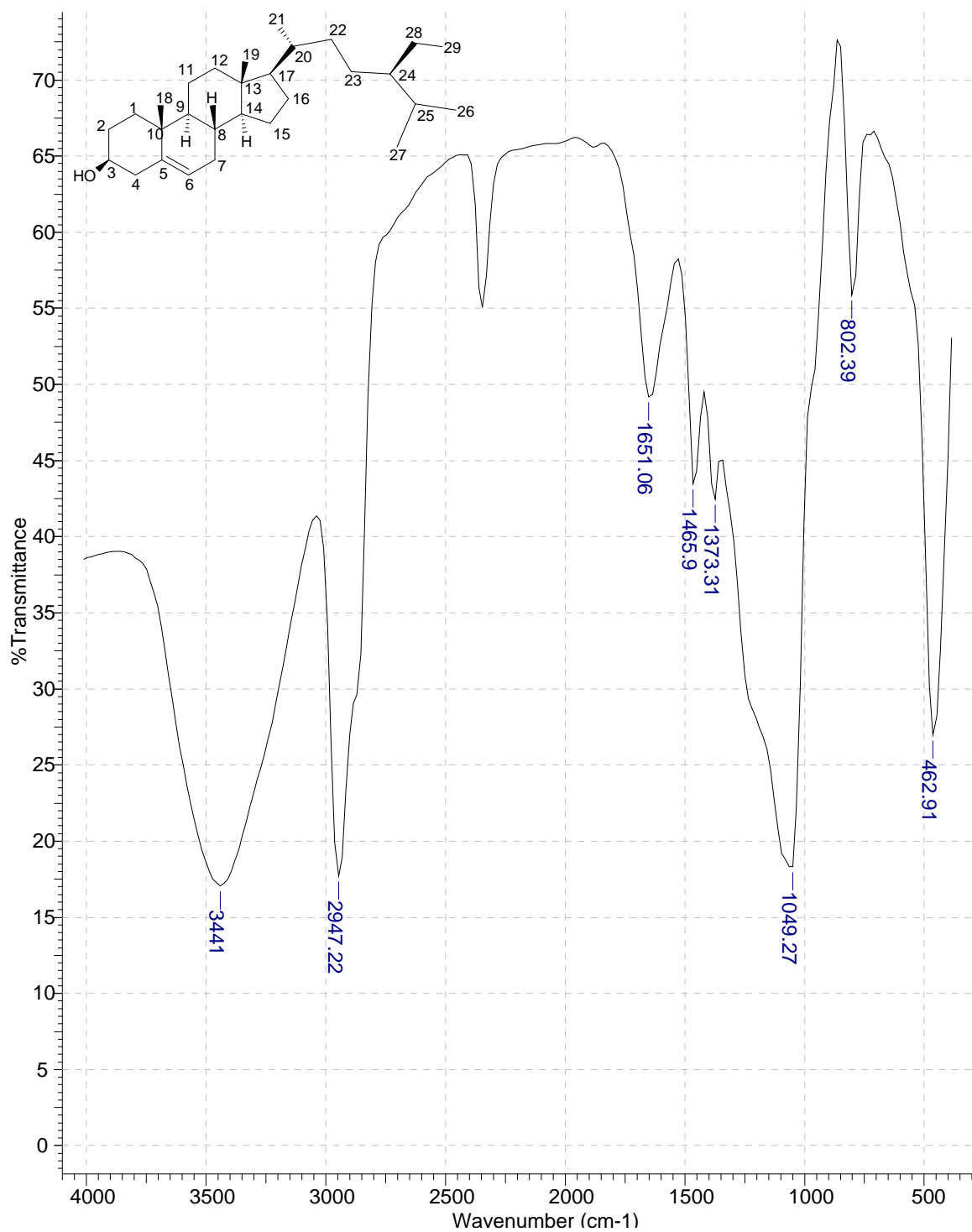


FIGURA 29 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FH-3

No espectro de RMN de ^1H Figura 30, foram observados 5 sinais integrando para 3H dos quais 2 são singletos em 0,713 e 1,043 δ , três dupletos em 0,885 δ ($J=1,4$), 0,863 δ ($J=1,3$) e em 0,829 δ ($J=2,0$) e um triplete em 0,91 δ ($J=5,8$). O grupo de absorções na região de 0,7-2,4 δ é típico de estruturas esteroidais.

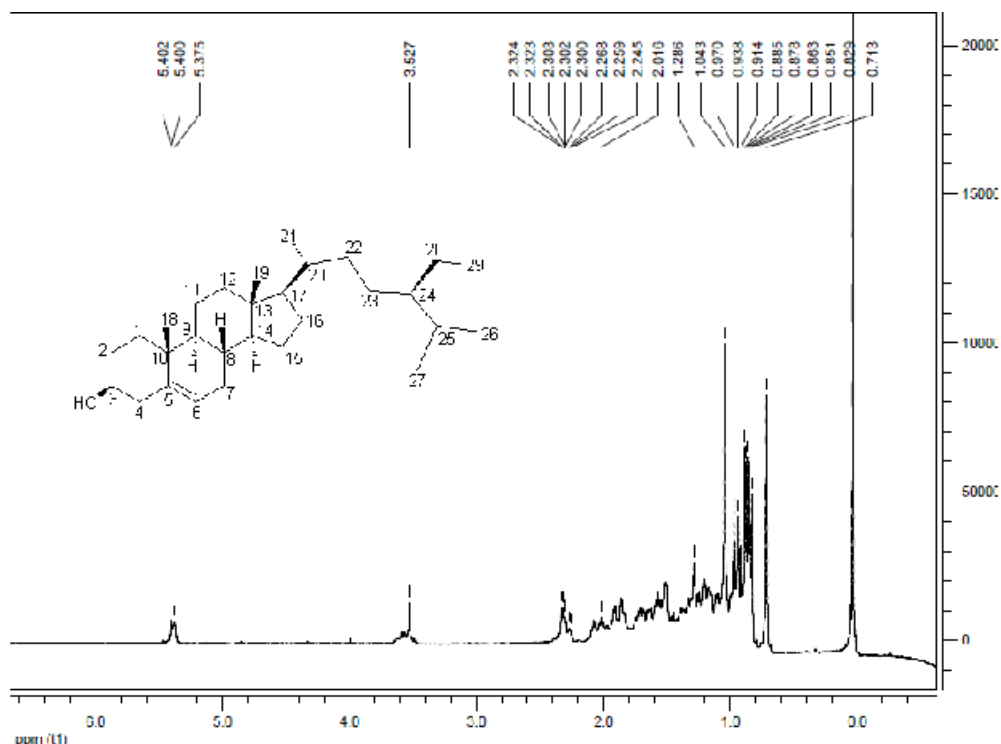


FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 HZ) DA SUBSTÂNCIA FH-3

A análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$ Figuras 31, 32 e 33 permitiram identificar um total de vinte e nove sinais de átomos de carbonos, ressaltando-se os seguintes sinais:

Sinal de 140,7 e 121,7 δ , correspondentes aos carbonos da ligação dupla trissubstituída nos carbonos 5-6;

Um sinal em 71,8 δ , correspondente ao carbono 3 ligado a uma hidroxila.

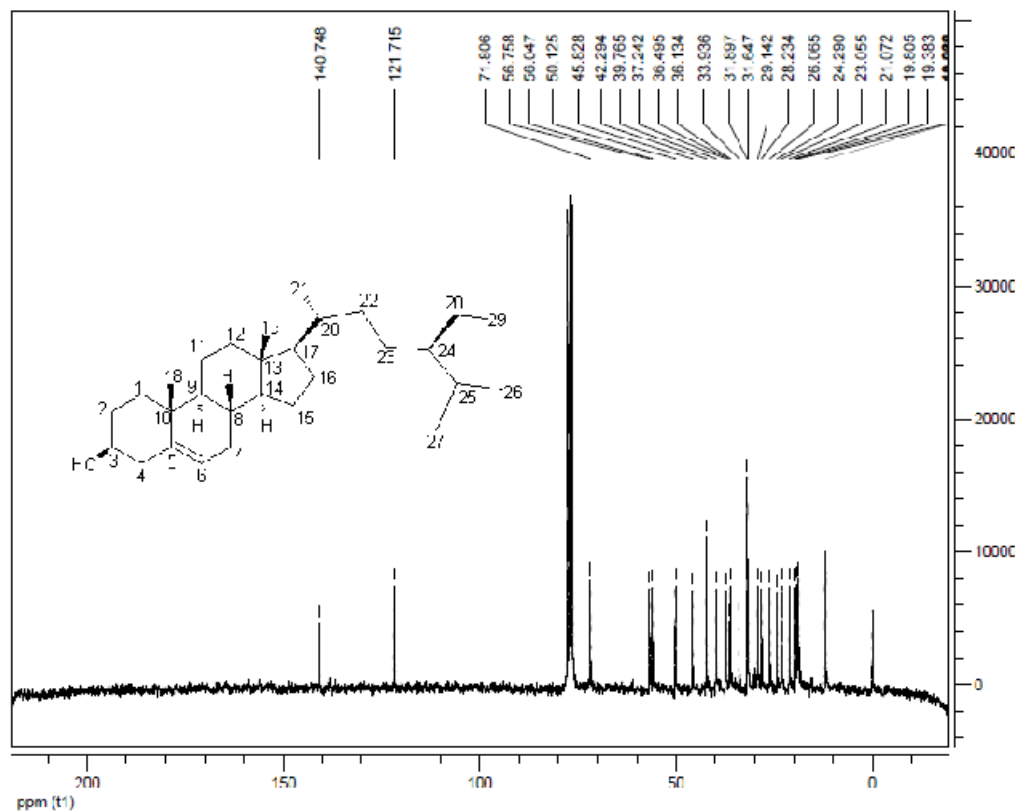


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-3

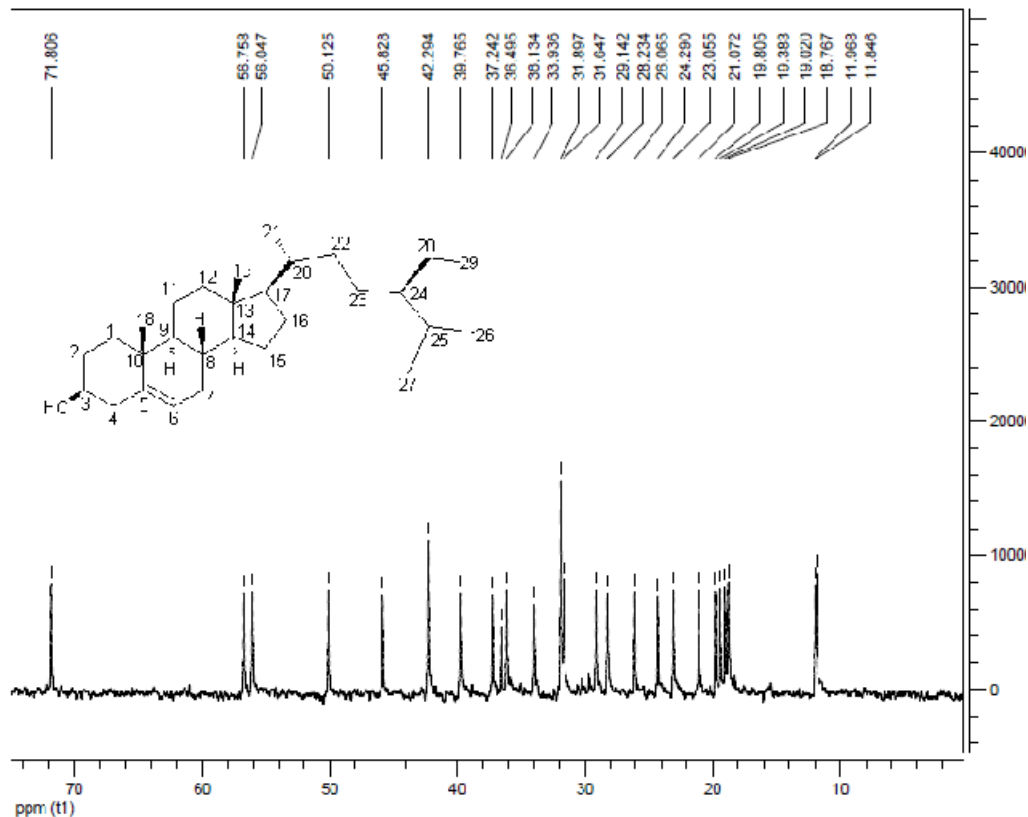


FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 50 Hz) DA SUBSTÂNCIA FH-3 EXPANDIDO NA REGIÃO DE 11,8 A 71,8 δ

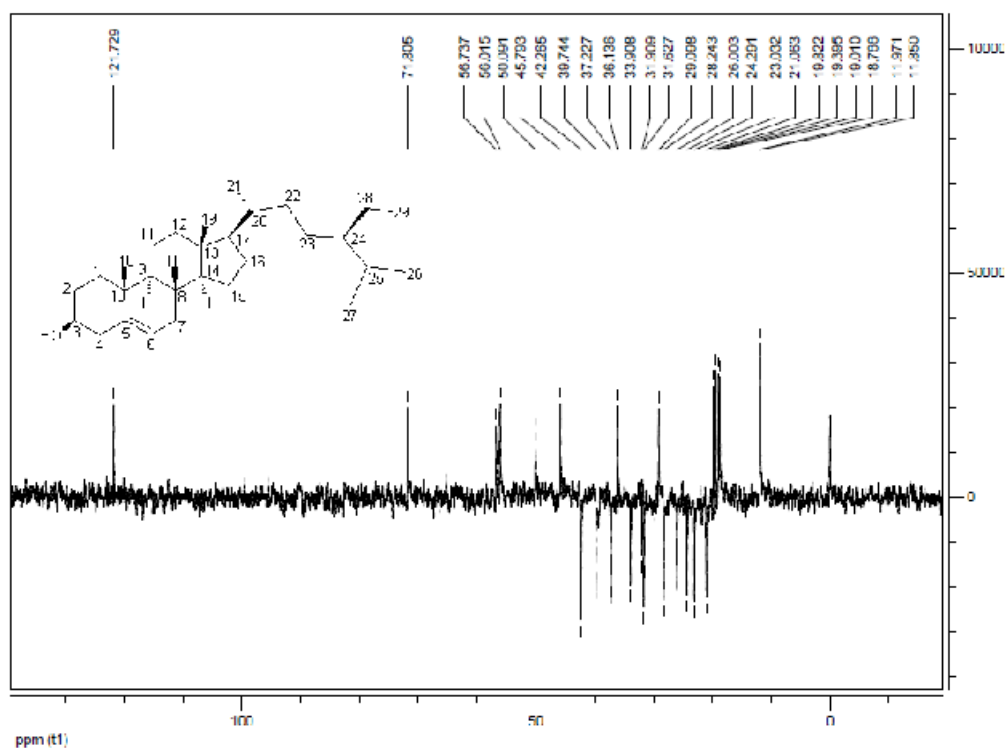


FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FH-3

Com base nos dados discutidos, descarta-se a hipótese de um triterpeno devido ao pequeno número de metilas, tratando-se, portanto, de um esteróide. Comparando-se os dados obtidos com os descritos na literatura (KOJIMA; HATANO, 1990), conforme mostra a Tabela 4, propõem-se para a substância FH-3, a estrutura do β sitosterol.

TABELA 4 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^{13}C /DEPT PARA FH-3 E DADOS DA LITERATURA PARA O β -SITOSTEROL (KOJIMA; HATANO, 1990)

C	β Sitosterol (Literatura)	Substância FH-3
1	37,2 (CH ₂)	37,2 (CH ₂)
2	32,6 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)
3	71,8 (CH)	71,8 (CH)
4	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)
5	140,7 (C)	140,7 (C)
6	121,7 (CH)	121,7 (CH)
7	31,9 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)
8	31,9 (CH)	31,9 (CH)
9	50,1 (CH)	50,1 (CH)
10	36,6 (C)	36,5 (C)
11	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)
12	39,9 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)
13	42,3 (C)	42,3 (C)
14	56,6 (CH)	56,0 (CH)
15	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)
16	28,8 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)
17	56,6 (C)	56,8 (C)
18	11,9 (CH ₃)	11,9 (CH ₃)
19	19,4 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)
20	36,1 (CH)	36,1 (CH)
21	18,8 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)
22	33,9 (CH ₂)	33,9 (CH ₂)
23	26,6 (CH ₂)	26,1 (CH ₂)
24	45,5 (CH)	45,8 (CH)
25	29,1 (CH)	29,1 (CH)
26	19,9 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)
27	19,0 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)
28	23,0 (CH ₂)	23,1 (CH ₂)
29	12,0 (CH ₃)	12,0 (CH ₃)

O β sitosterol, Figura 34, é um fitoesteróide, bem comum em plantas, já isolado anteriormente da espécie *Celtis sinensis* (KIM *et al.*, 2005).

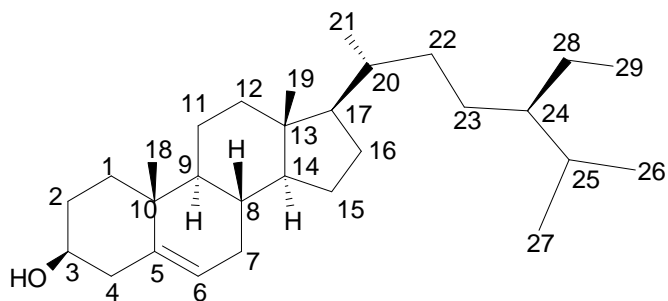


FIGURA 34 - ESTRUTURA DO β SITOSTEROL

5.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA FC-4 ISOLADA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

Da fração clorofórmio foi coletado 199 frações em frascos de aproximadamente 15 mL cada, que foram reunidas de acordo com semelhanças observadas na análise em CCD. Após evaporação do solvente foi observado cristalizações de precipitado amarelo em vários frascos. Essas amostras foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD). Fase móvel 25 mL:8 mL:2 mL acetato de etila:acetona:água). Com a visualização das placas no UV em 366 nm, as frações 79 a 84 foram dissolvidas em metanol e reunidas em um mesmo frasco, por tratarem da mesma substância, após evaporação do solvente o precipitado foi submetido à filtração utilizando como solvente de lavagem clorofórmio, em funil sinterizado G3 à vácuo. Após purificação a substância foi identificada como FC-4 (9,1 mg).

A substância FC-4 foi isolada como um sólido em forma de pó fino amarelo com os seguintes dados espectrais:

O espectro no infravermelho em pastilha de KBr, Figura 35 apresentou absorção em $3425,57\text{ cm}^{-1}$, sugerindo a presença de heteroátomo ligado a C, uma banda intensa e larga com máximo de absorção em $3302,12\text{ cm}^{-1}$ característica do estiramento da ligação O-H, observou-se também uma banda em $1651,06\text{ cm}^{-1}$, característica de absorção de carbonila de amida, absorção em $1450,47\text{ cm}^{-1}$, indicando a presença de duplas ligações de anel aromático.

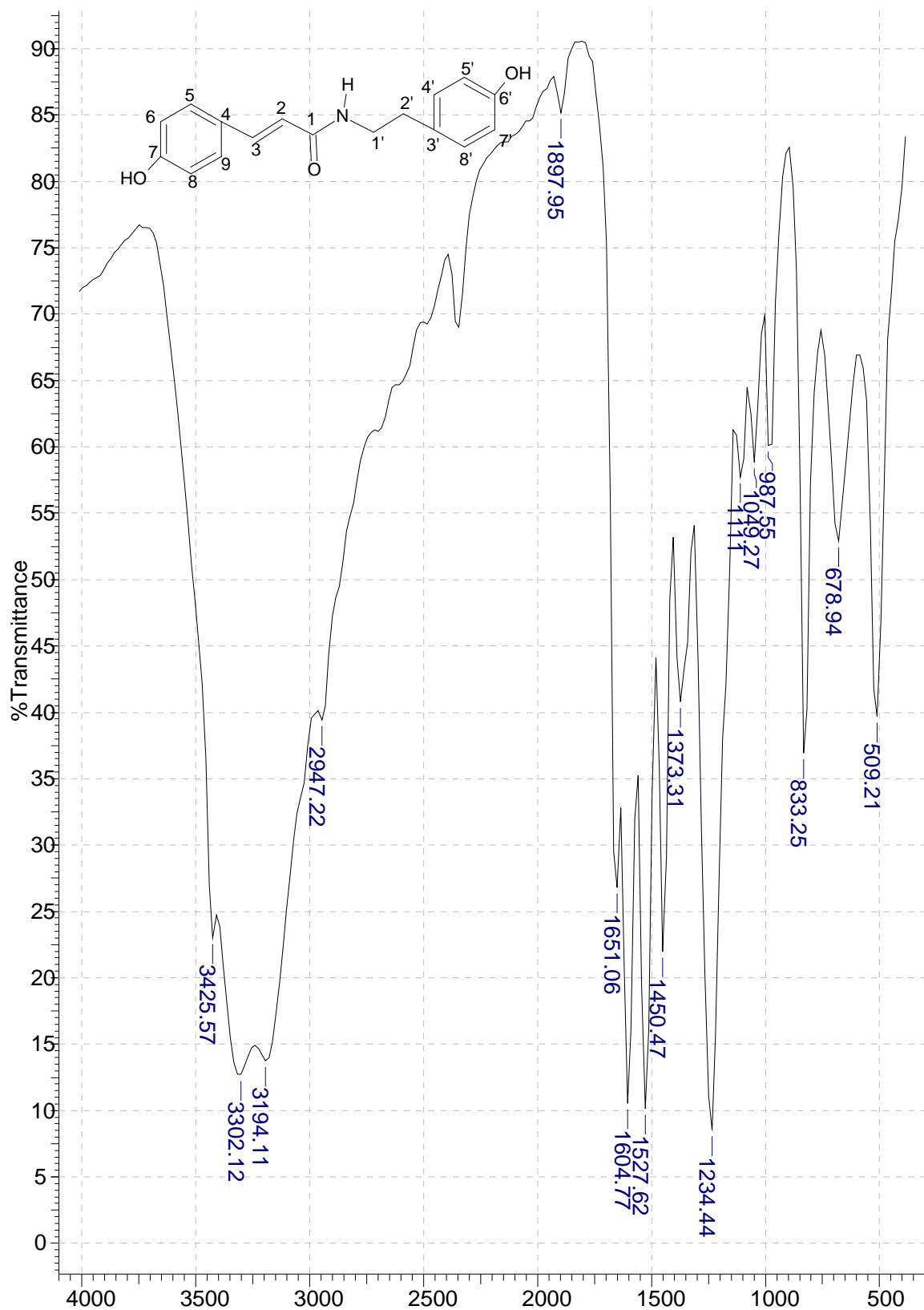


FIGURA 35 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA C-4

Observou-se no espectro de RMN de ^1H , Figuras 36 dois tripletos em 2,74 δ e 3,45 δ com constante de acoplamento de 7,3 Hz integrando para 2 H cada, indicando que os hidrogênios são geminais e, portanto devem ser um sistema CH_2CH_2 isolado. Observou-se também a presença de 2 dublete em 6,37 δ e 7,43 δ (1 H, $J = 15,8$ Hz) referente a hidrogênio sobre ligação dupla em posição trans. E finalmente 2 conjuntos de 2 dubletes em 6,71 δ e 7,04 δ ; e 6,78 δ e 7,39 δ região típica de anel aromático *p*-dissubstituído.

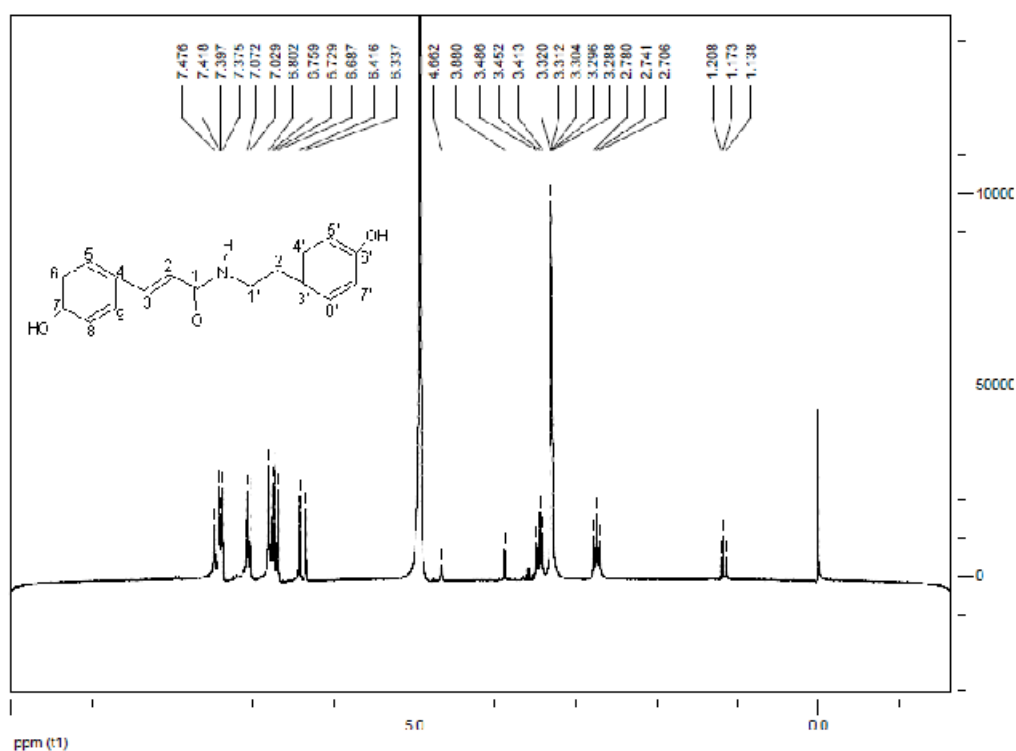


FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN ^1H (CH_3OH , 200 HZ) DA SUBSTÂNCIA FC-4

As análises conjuntas dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$, Figuras 37 a 40, mostraram 13 sinais: dos quais 2 são metilênicos (35,9 δ e 42,6 δ), 6 são metínicos (116,3 δ ; 116,7 δ ; 118,5 δ ; 130,6 δ ; 130,7 δ e 141,8 δ) e 5 são quaternários (127,8 δ ; 131,3 δ ; 157,0 δ ; 160,5 δ e 169,3 δ), sendo que o sinal em 169,3 δ sugere uma carbonila de função amida.

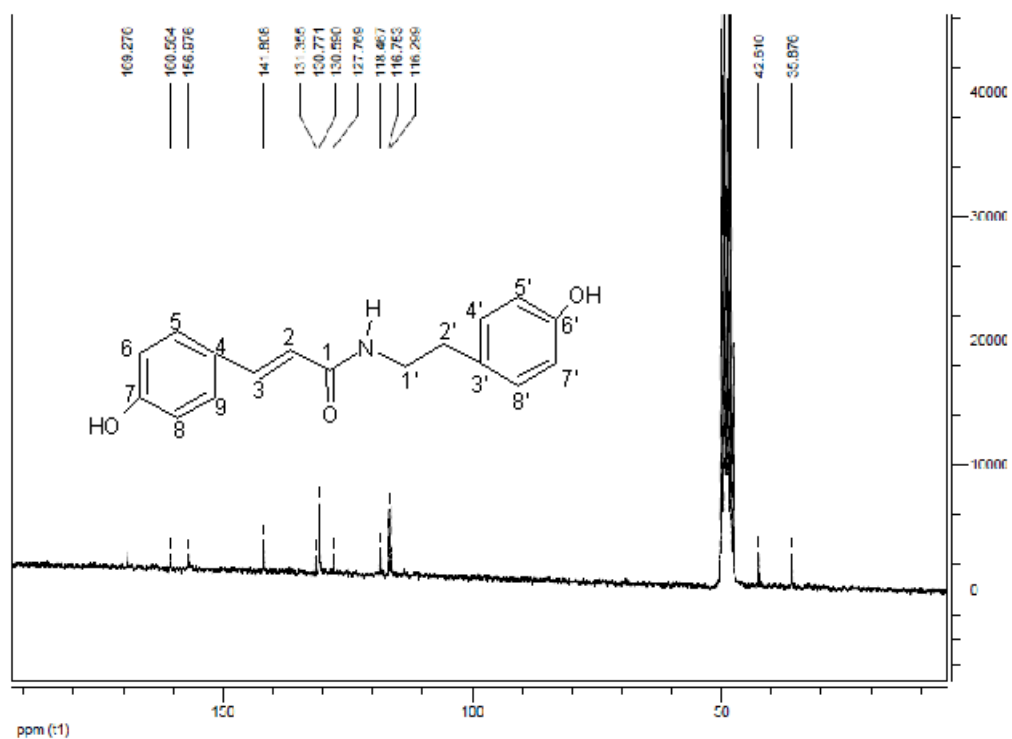


FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN ¹³C DA SUBSTÂNCIA FC-4 (CH₃OH, 50 HZ)

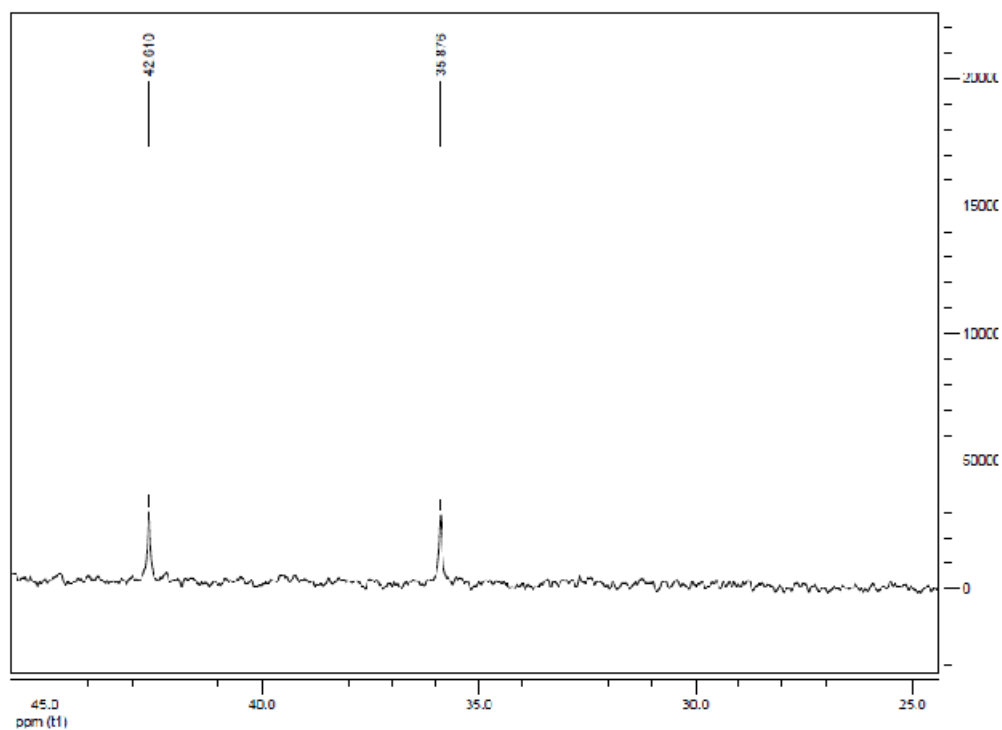


FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN ¹³C (CH₃OH, 50 HZ) DA SUBSTÂNCIA FC-4 EXPANDIDO DE 35,9 A 42,6 δ

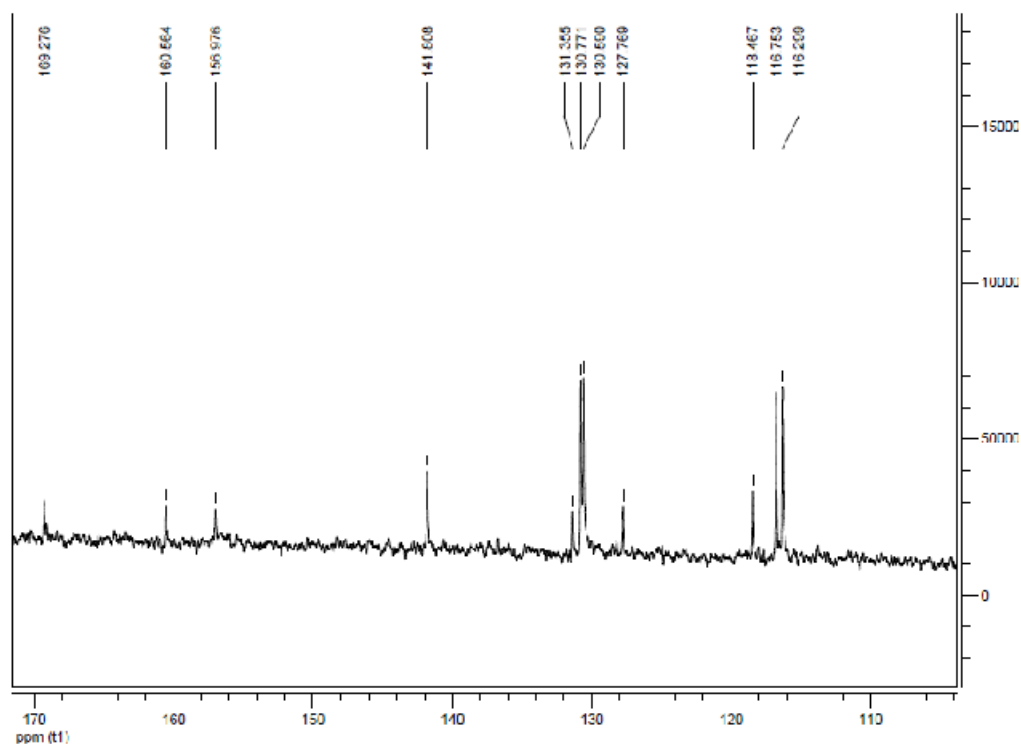


FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (CH_3OH , 50 HZ) DA SUBSTÂNCIA FC-4 EXPANDIDO DE 116,3 A 169,3 δ

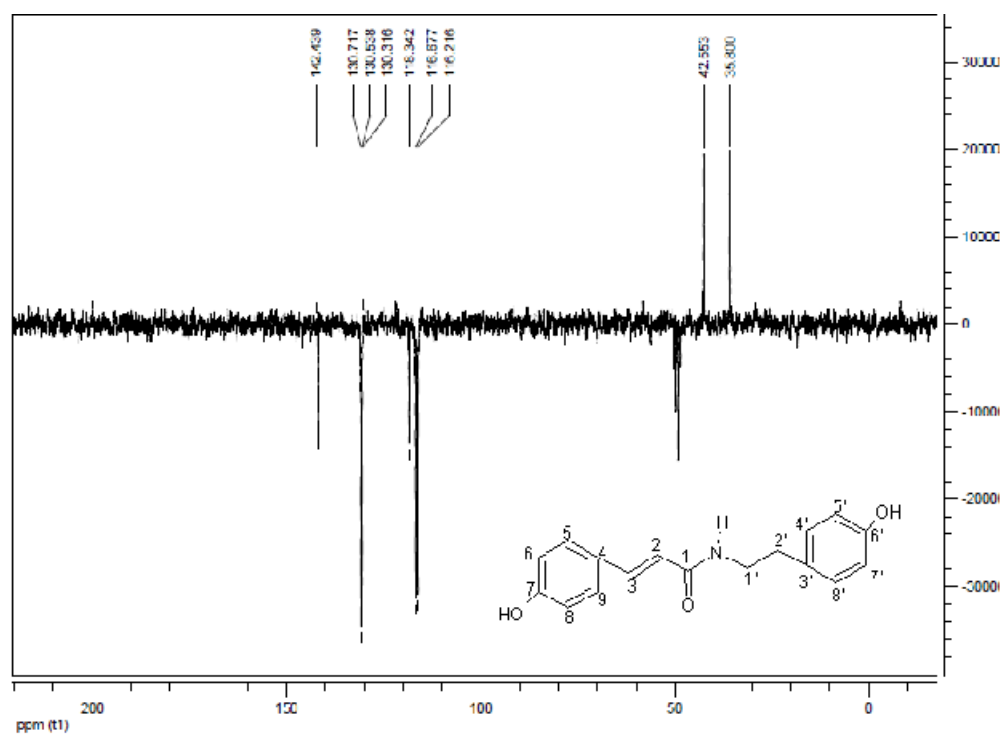


FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FC-4

Com base nos dados discutidos associados à análise comparativa com a descrita na literatura (KUO *et al.*, 2007 e KIM; LEE, 2003), conforme mostram as Tabela 5 e 6, permitiram propor para a substância FC-4, a estrutura do *N-trans-p*-coumaroiltiramina, um composto de 17 carbonos, que apresenta mesma intensidade de sinais entre os carbonos do anel aromático: C-6 e C-8; C-5' e C-7'; C-5 e C-9; C-4' e C-8'; motivo pelo qual o espectro de RMN ^{13}C apresenta apenas 13 sinais.

TABELA 5 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^1H PARA FC-4 E DADOS DA LITERATURA PARA O *N-TRANS-P-COUMAROILTIRAMINA* (KUO *et al.*, 2007)

	<i>N-trans-p</i> -coumaroiltiramina (KUO <i>et al.</i> , 2007)	Substância FC-4
H-2'	2,74 (2H, t, J= 7,6)	2,74 (2H, t, J=7,8)
H-1'	3,45 (2H, t, J=7,6)	3,45 (2H, t, J=7,8)
H-2	6,37(1H, d, J=15,6)	6,37 (1H, d, J=15,8)
H-5' e H-7'	6,71(2H, d J= 8,8)	6,71 (2H, d, J=8,4)
H-6 e H-8	6,78 (2H, d, J=8,8)	6,78 (2H, d, J=8,6)
H-4' e H-8'	7,04 (2H, d, J= 8,4)	7,05 (2H, d, J=8,6)
H-3	7,43 (1H,d,J=15,6)	7,43 (1H, d, J=15,8)
H-5 e H-9	7,39(2H, d,J=8,8)	7,38 (2H, d, J=8,6)

TABELA 6 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^1H PARA A FC-4 E DADOS DA LITERATURA PARA O *N-TRANS-P-COUMAROILTIRAMINA* (KUO *et al.*, 2007; KIM; LEE, 2003)

Carbono	<i>N-trans-p</i> - coumaroiltiramina (KUO <i>et al.</i> , 2007)	<i>N-trans-p</i> - coumaroiltiramina (KIM; LEE, 2003)	Substância FC-4
(C-2')	34,7	35,8	35,9
(C-1')	41,3	42,6	42,6
(C-6,8)	115,4	116,3	116,3
(C-5',7')	115,5	116,7	116,7
(C-2)	119,2	118,3	118,5
(C-4)	127,2	127,6	127,8
(C-5,9)	129,4	130,6	130,6
(C-4',8')	129,4	130,7	130,7
(C-3')	129,6	131,3	131,3
(C-3)	139,3	141,8	141,8
(C-6')	156,0	156,9	157,0
(C-7)	159,0	160,6	160,5
(C-1)	165,6	169,2	169,3

O *N-trans-p-coumaroiltiramina*, Figura 41, pertence ao grupo das amidas, e já foi isolado anteriormente de algumas espécies da família Ulmaceae, Kuo *et al.*, (2007) isolaram do extrato metanólico de *Trema orientalis*. Kim e Lee, (2003), também isolaram esta substância da espécie *Celtis sinensis*, e a testaram frente à acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise metabólica da acetilcolina, e constataram que apresenta efeito inibitório a essa enzima.

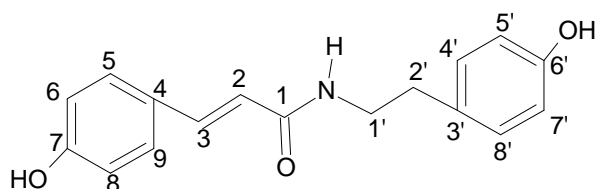


FIGURA 41 - ESTRUTURA DO *N-TRANS-P-COUMAROILTIRAMINA*

5.5 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Celtis iguanaea*

5.5.1 Avaliação do crescimento

No bioensaio para o potencial alelopático sobre o desenvolvimento das plântulas de *Lactuca sativa* foram avaliados os efeitos do extrato bruto e das frações obtidas das cascas de *Celtis iguanaea* sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo, Figura 42.

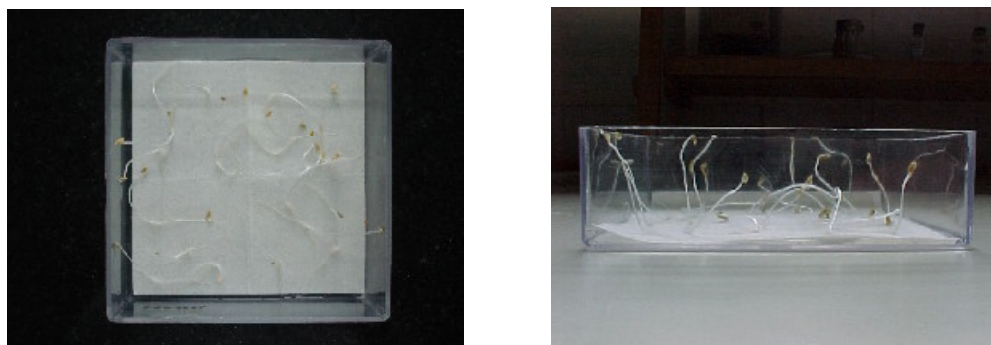


FIGURA 42 - CAIXA GERBOX APÓS 7 DIAS DE GERMINAÇÃO

A Tabela 7 demonstra os resultados obtidos na avaliação da influência do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL, sobre o crescimento da radícula das sementes da espécie *Lactuca sativa*. Apenas o extrato bruto na concentração de 0,1 mg/mL, foi estatisticamente diferente do controle, de acordo com os resultados apresentados houve estimulação do crescimento da radícula, quando comparada ao controle água de 29,64 %. Na Tabela 8 está demonstrado os resultados obtidos na avaliação da influência do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/mL, sobre o crescimento do hipocótilo das sementes da espécie *Lactuca sativa*. O extrato bruto na concentração de 0,1 mg/mL, é estatisticamente diferente do controle, de acordo com os resultados apresentados houve inibição de 34,97 % do crescimento dos hipocótilos quando comparado aos hipocótilos em que cresceram na presença da água, usada como controle. As demais frações não apresentaram alteração estatisticamente significativa, quando comparadas ao controle.

A atividade alelopática do extrato bruto pode ser devido a presença dos compostos friedelina e epifriedelinol, pois Santos *et al.*, (2008) após estudo da atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu sobre as plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*), e mata-pasto (*Senna obtusifolia*), relatam que os compostos friedelina e epifriedelinol juntos apresentaram alto potencial alelopático sobre a germinação das sementes destas espécies, sendo que esta influência se dá em função do pH do meio.

TABELA 7 - TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA COM O EXTRATO BRUTO E AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

CONCENTRAÇÃO	REPETIÇÃO	FRAÇÃO				
		EB	FH	FC	FAE	FR
0,1	1	4,760 b	3,975 a	3,975 a	3,740 a	3,900 a
	2	5,100 b	3,775 a	3,775 a	3,820 a	3,920 a
	3	5,100 b	3,560 a	3,560 a	3,840 a	3,860 a
	4	4,875 b	3,940 a	3,940 a	3,560 a	4,025 a
0,2	1	4,060 a	4,340 a	4,340 a	3,660 a	3,760 a
	2	3,900 a	4,440 a	4,440 a	3,780 a	3,620 a
	3	4,260 a	4,150 a	4,150 a	3,600 a	3,700 a
	4	4,020 a	4,275 a	4,275 a	2,800 a	2,725 a
0,4	1	3,800 a	3,820 a	3,820 a	3,620 a	7,940 a
	2	3,700 a	3,880 a	3,880 a	3,480 a	3,560 a
	3	3,760 a	4,000 a	4,000 a	3,520 a	3,580 a
	4	3,500 a	4,160 a	4,160 a	3,425 a	3,650 a
0,8	1	3,900 a	3,740 a	3,740 a	4,000 a	3,740 a
	2	3,950 a	3,840 a	3,840 a	3,860 a	3,760 a
	3	3,900 a	3,460 a	3,460 a	3,880 a	3,700 a
	4	3,325 a	3,940 a	3,940 a	3,580 a	2,725 a
CONTROLE	1	4,020 a	3,720 a	3,720 a	3,800 a	3,800 a
ÁGUA	2	3,980 a	3,280 a	3,280 a	4,160 a	4,160 a
	3	4,080 a	3,000 a	3,000 a	4,075 a	4,075 a
	4	4,025 a	3,400 a	3,400 a	4,075 a	4,075 a

NOTA: (1) Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

(2) EB = extrato bruto; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio, FAcOEt = fração acetato de etila; FR = fração remanescente

TABELA 8 - TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO COM O EXTRATO BRUTO E AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

CONCENTRAÇÃO	REPETIÇÃO	FRAÇÃO				
		EB	FH	FC	FAE	FR
0,1	1	2,600 b	3,725 a	3,280 a	3,420 a	3,440 a
	2	2,340 b	3,220 a	3,220 a	3,400 a	2,780 a
	3	2,340 b	3,440 a	3,600 a	3,040 a	3,340 a
	4	2,150 b	3,640 a	3,425 a	3,360 a	2,750 a
0,2	1	3,700 a	3,120 a	3,650 a	3,000 a	3,040 a
	2	3,840 a	3,660 a	3,920 a	3,083 a	2,920 a
	3	3,600 a	3,425 a	3,725 a	3,425 a	3,020 a
	4	3,740 a	3,620 a	3,925 a	3,175 a	3,175 a
0,4	1	4,080 a	3,900 a	3,040 a	3,200 a	3,240 a
	2	3,480 a	3,860 a	2,740 a	3,240 a	3,400 a
	3	3,760 a	4,000 a	3,220 a	3,160 a	3,340 a
	4	3,825 a	4,020 a	2,900 a	3,650 a	3,325 a
0,8	1	3,680 a	3,000 a	3,260 a	3,060 a	2,900 a
	2	3,700 a	3,220 a	3,520 a	3,100 a	2,950 a
	3	3,533 a	3,440 a	3,580 a	2,820 a	2,900 a
	4	3,550 a	3,560 a	3,960 a	3,180 a	2,750 a
CONTROLE	1	3,660 a	2,650 a	3,060 a	3,380 a	3,380 a
ÁGUA	2	3,740 a	3,220 a	3,620 a	3,480 a	3,480 a
	3	3,820 a	3,440 a	3,560 a	2,820 a	3,020 a
	4	3,720 a	3,560 a	3,050 a	3,180 a	3,700 a

NOTA: (1) Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

(2) EB = extrato bruto; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio, FAcOEt = fração acetato de etila; FR = fração remanescente

5.5.2 Avaliação da germinação

Pelos valores mostrados na Tabela 9, os resultados do teste de Scott-Knott realizado sobre os índices de velocidade de germinação frente ao extrato bruto e as frações obtidas do extrato etanólico, quando comparados ao controle testado, demonstram ser estatisticamente iguais, não apresentando portanto, influência

estatisticamente significativa no Índice de Velocidade de Germinação (IVG) frente ao controle.

TABELA 9 - TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM O EXTRATO BRUTO E AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

CONCENTRAÇÃO	REPETIÇÃO	FRAÇÃO				
		EB	FH	FC	FAE	FR
0,1	1	3,500 a	4,500 a	4,500 a	4,500 a	4,750 a
	2	4,500 a	3,500 a	3,500 a	3,500 a	4,000 a
	3	5,000 a	4,000 a	4,000 a	4,500 a	2,830 a
	4	5,000 a	5,000 a	5,000 a	4,000 a	5,000 a
0,2	1	5,000 a	4,833 a	4,833 a	4,330 a	4,330 a
	2	5,000 a	4,500 a	4,500 a	3,330 a	3,830 a
	3	4,500 a	3,500 a	3,500 a	2,830 a	4,000 a
	4	4,000 a	5,000 a	5,000 a	4,000 a	4,000 a
0,4	1	5,000 a	4,500 a	4,500 a	4,830 a	4,750 a
	2	5,000 a	4,500 a	4,500 a	4,530 a	5,000 a
	3	5,000 a	4,500 a	4,500 a	5,000 a	4,330 a
	4	4,500 a	4,500 a	4,500 a	5,000 a	4,330 a
0,8	1	3,833 a	5,000 a	5,000 a	5,000 a	4,250 a
	2	4,500 a	4,833 a	4,833 a	4,500 a	3,830 a
	3	5,000 a	4,500 a	4,500 a	4,800 a	3,830 a
	4	5,000 a	2,000 a	2,000 a	4,500 a	3,830 a
CONTROLE	1	5,000 a	4,500a	4,500 a	4,500 a	4,500 a
ÁGUA	2	5,000 a	4,500 a	4,500 a	5,000 a	5,000 a
	3	5,000 a	4,500 a	4,500 a	4,330 a	4,330 a
	4	4,500 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a

NOTA: (1) Valores seguidos de letras semelhantes não diferem estatisticamente entre si.

(2) EB = extrato bruto; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio, FAcOEt = fração acetato de etila; FR = fração remanescente

5.6 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea* FRENTE À *Artemia salina*

Neste ensaio, foram submetidas amostras do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente.

Segundo MEYER et al., (1982), extratos com valores de LC50 inferiores a 1000 µg/mL são considerados bioativos. Conforme os resultados que estão demonstrados no Tabela 10, pode-se observar que as amostras testadas não apresentam bioatividade frente à *Artemia salina*, pois em todas as concentrações as LC50 foram superiores a 1000 µg/mL.

TABELA 10 - ANÁLISE DE TOXICIDADE DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea* SOBRE *Artemia salina*

AMOSTRA	Concentração (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
Fração Hexano	10	>1000	-
	100		
	1000		
Fração Clorofórmio	10	>1000	-
	100		
	1000		
Fração Acetato de Etila	10	> 1000	-
	100		
	1000		
Extrato etanólico remanescente	10	>1000	-
	100		
	1000		
Extrato Bruto	10	>1000	-
	100		
	1000		
Sulfato de quinidina	10	50,12	35,80-70,16
	100		
	1000		

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Celtis iguanaea*

5.7.1 Ensaio pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio

Por esse método, os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR% (ácido ascórbico) e AAR% (rutina)) e os cálculos estabelecidos através das seguintes equações:

$$\text{AAR\%}(\text{ácido ascórbico}) = \frac{\text{Abs(amostra)} - \text{Abs (branco)} \cdot 100}{\text{Abs(ac. ascórbico)} - \text{Abs(branco)}}$$

$$\text{AAR\%}(rutina) = \frac{\text{Abs(amostra)} - \text{Abs (branco)} \cdot 100}{\text{Abs(rutina)} - \text{Abs(branco)}}$$

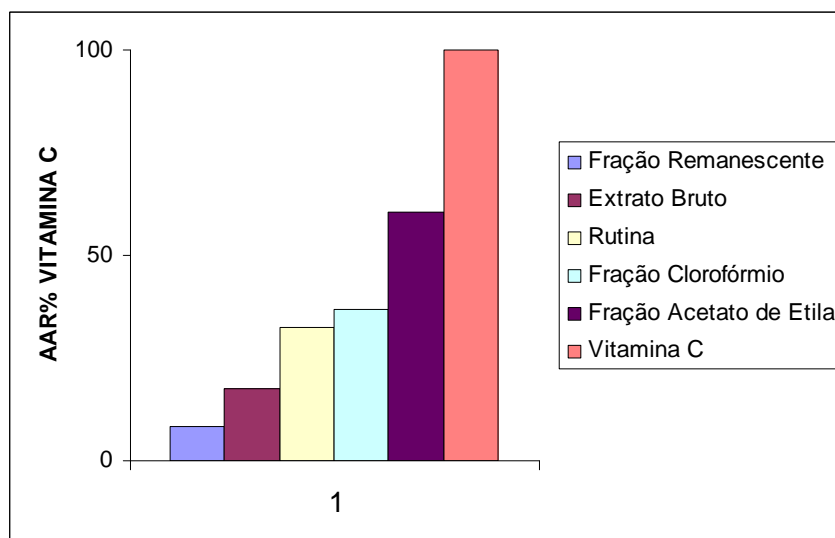
Considera-se que a vitamina C apresenta atividade de 100% por ser uma substância de potente ação antioxidante (PRIETO, 1999). A Tabela 11 mostra os resultados de AAR% obtidos em relação à vitamina C para a rutina, o extrato bruto e as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Quando comparado à vitamina C, a rutina obteve uma AAR de aproximadamente 32,4 % com desvio padrão de 0,835225, o extrato bruto uma AAR de 17,51%, com desvio padrão de 0,222785, a fração clorofórmio 37,02%, com desvio padrão de 0,41187; a fração acetato de etila 60,39% com desvio padrão de 0,45611 e a fração remanescente 8,25% com desvio padrão de 0,4358.

TABELA 11 - AAR% (VITAMINA C) DA RUTINA, DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO E ACETATO DE ETILA DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

	AAR% (Vitamina C)
Rutina	32,4 %
Extrato Bruto	17,51
Fração Clorofórmio	37,02
Fração Acetato de Etila	60,39
Fração Remanescente	8,25

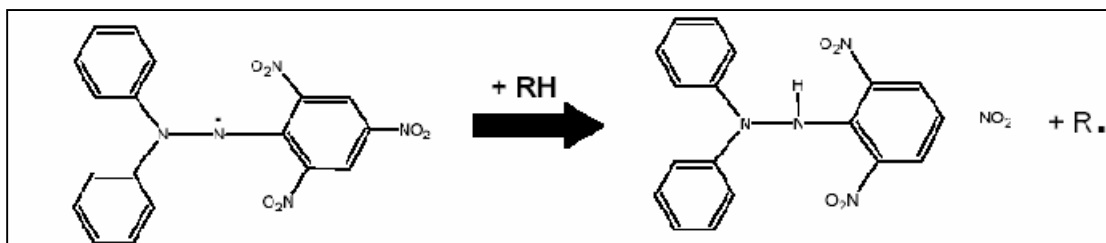
Comparando a atividade antioxidante da vitamina C e rutina com a do extrato bruto e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, Gráfico 1 observa-se que a fração clorofórmio apresenta uma atividade antioxidante um pouco superior a da rutina, considerando que a rutina é muito usada em experimentos como padrão para atividade antioxidante, pode-se considerar significativa a atividade desta fração. Tendo em vista que a fração acetato de etila apresentou aproximadamente 60% da atividade antioxidante da vitamina C, pode ser considerada com alto potencial antioxidante.

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, E DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE COM OS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C



5.7.2 Ensaio pelo método de redução do radical DPPH

O DPPH é um radical estável que, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina de acordo com a representação da Figura 43.



FONTE: COSTA, 2007

FIGURA 43 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO DPPH

Essa redução é acompanhada em comprimentos de onda de 517 a 520 nm pela diminuição da absorbância, uma vez que ocorre uma mudança na coloração violeta (característica do radical) para amarela enquanto a reação se processa. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (COSTA, 2007).

Existem algumas maneiras de expressar o resultado do ensaio quantitativo com DPPH. Aqui, o resultado foi expresso pelo valor de IC₅₀, isto é, a porcentagem de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Quanto menor for esse valor, maior é a capacidade antioxidante da substância. Na Tabela 12 estão apresentados os valores das equações das retas obtidas para a análise do extrato bruto, e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente.

TABELA 12 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA DO GRÁFICO AA% *VERSUS* CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*

AMOSTRA	EQUAÇÃO
Vitamina C	$y = 9,4706x - 8,0616$ $R^2 = 0,9928$
Rutina	$y = 6,9321x + 3,4105$ $R^2 = 0,9997$
Extrato Bruto	$y = 0,1911x + 13,673$ $R^2 = 0,9848$
Fração Hexano	$y = 0,223x - 7,516$ $R^2 = 0,9767$
Fração Clorofórmio	$y = 0,2622x + 26,323$ $R^2 = 0,9058$
Fração Acetato de Etila	$y = 0,599x + 16,985$ $R^2 = 0,9857$
Fração Remanescente	$y = 0,1208x + 1,9769$ $R^2 = 0,9961$

Considerando que o valor de y é 50, no Tabela 13 temos a concentração em µg/mL de cada amostra para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. Os resultados foram obtidos por regressão linear dos pontos plotados graficamente.

TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{g/mL}$ NECESSÁRIA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*, E DOS PADRÕES VITAMINA C E RUTINA PARA REDUZIR 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO
Vitamina C	6,13
Rutina	6,71
Extrato Bruto	190,09
Fração Hexano	257,92
Fração Clorofórmio	90,30
Fração Acetato de Etila	55,12
Fração Remanescente	397,54

Comparando-se os resultados observa-se uma grande diferença de valores de concentração necessária para reduzir 50 % de DPPH entre as frações e extrato bruto, a fração acetato de etila foi a que apresentou a melhor atividade antioxidante 55,12 $\mu\text{g/mL}$, a fração clorofórmio foi de 90,30 $\mu\text{g/mL}$, seguida do extrato bruto 190,09 $\mu\text{g/mL}$, e as frações hexano e remanescente apresentaram uma atividade relativamente baixa comparada as demais amostras 257,92 e 397,54 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, isso mostra que as substâncias que apresentam atividade antioxidante estão concentradas principalmente na fração acetato de etila e em menor quantidade na fração clorofórmio. Comparando os resultados com os padrões vitamina C e rutina observa-se que a atividade antioxidante apresentada pelas frações acetato de etila e clorofórmio estão em nível intermediário, sendo que futuras investigações se fazem necessárias para pesquisa e isolamento de substâncias presentes nestas frações com potencial antioxidante.

A atividade antioxidante encontrada nas frações testadas pode ser atribuída aos grupos de compostos flavonóides e cumarinas presentes na espécie, de acordo com o resultado da análise fitoquímica preliminar, uma vez que esses compostos apresentam em suas estruturas grupamentos fenólicos, os quais na sua grande maioria apresentam atividade antioxidante.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Celtis iguanaea*

5.8.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Neste método o conteúdo de todos os tubos, exceto os controles negativos, turvaram, indicando que nas concentrações testadas o extrato bruto e frações aplicadas não inibiram o crescimento bacteriano, sendo inativos às bactérias testadas.

5.8.2 Difusão em Disco

A avaliação da atividade antibacteriana foi testada na concentração de 1000 µg por disco de extrato bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, os resultados dos halos de inibição são apresentados na Tabela 14 e 15 estão as médias dos halos de inibição dos controles dos solventes utilizados (metanol, etanol, e hexano) e do controle positivo (cloranfenicol).

TABELA 14 - MÉDIA DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DAS CASCAS DE *Celtis iguanaea*, NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM DISCO

MICRORGANISMO	CONCENTRAÇÃO DE 1000 µg				
	EB	FH	FC	F AcOEt	FR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	8	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	6	6	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0	0	0

EB = extrato bruto; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio, FAcOEt = fração acetato de etila; FR = fração remanescente

TABELA 15 - MÉDIA DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM DISCO

MICRORGANISMO	CONTROLE			
	METANOL	HEXANO	ETANOL	CLORANFENICOL (30 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	28
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	33,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	19,5
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	32,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0	31,5

Observou-se que as frações hexano e clorofórmio apresentaram uma pequena atividade frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, pelo método de difusão em disco, que não foi confirmado pelo método CMI.

6 CONCLUSÃO

A análise fitoquímica pré-liminar realizada com as casca da espécie *Celtis iguanaea* indicou a presença dos seguintes grupos fitoquímicos: flavonóides, esteróides e triterpenos, no extrato hidroalcoólico, e taninos e aminogrupos, no extrato aquoso.

Do fracionamento do extrato hexano foram identificados 3 compostos: o β sitosterol um fitoesteróide, bem comum em plantas, já isolado anteriormente da espécie *Celtis sinensis*; a friedelina e o epifriedelinol, ambos triterpenos pentacíclico da série friedelano.

Do fracionamento do extrato clorofórmio foi identificado a *N-trans-p*-coumaroil tiramina, uma amida com atividade anticolinesterásica, já isolada anteriormente da família Ulmaceae, nas espécies *Celtis sinensis* e *Trema orientalis*.

No ensaio alelopático, apenas o extrato bruto na concentração de 0,1 mg/mL apresentou influência sobre a espécie *Lactuca sativa*, foi observado uma inibição do crescimento do hipocótilo de 34,97 % e aumento do crescimento da radícula de 29,64 %, as demais concentrações e frações testadas não apresentaram interferência sobre a espécie.

Para o ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina*, a espécie apresentou LC50 superior a 1000 μ g/mL, não sendo considerada portanto bioativa de acordo com Meyer *et al.*, (1982).

Não foi observada atividade antibacteriana significativa em nenhuma das concentrações das frações frente às cepas testadas.

Foi observada atividade antioxidante no extrato bruto, e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente em ambos os métodos utilizados, sendo que pelo método do fosfomolibdênio a fração clorofórmio apresentou uma atividade antioxidante equivalente a da rutina e a fração acetato de etila equivalente a aproximadamente 60 % da vitamina C, podendo ser considerada com alto potencial antioxidante. Porém esse resultado não se repetiu quando realizado o ensaio do DPPH, ficando a atividade antioxidante do extrato bruto e frações com valores bem inferiores aos do método do fosfomolibdênio. Essa divergência de resultados pode ser devido a especificidade dos métodos por determinados tipos de substância (mais hidrofílicas ou lipofílicas), ou também pelo fato de a interação de uma espécie antioxidante com a molécula de DPPH depender da especificidade pela conformação estrutural do radical livre (MENSOR *et al.*, 2001).

Embora neste trabalho tenha sido usada a classificação taxonômica descrita por Cronquist (1981), que enquadra o gênero *Celtis* na família Ulmaceae, com o isolamento do composto *N-trans-p*-coumaroil tiramina, uma amida já isolada anteriormente da espécie *Cannabis sativa* (YAMAMOTO; et al., 1991) família Cannabaceae, esse trabalho pode contribuir para reiterar a classificação segundo a APG II que insere os gêneros *Celtis* e *Trema* nessa família. Sugerimos ainda que essas amidas possam ser usadas como marcador químico da família Cannabaceae, já que outras amidas já foram isoladas (SANCHEZ; VERPOORTE, 2008), e por serem pouco comuns nas plantas em geral, quando presentes na família ou gênero, esse grupo de metabólitos secundário costumam ser usados como marcadores quimiotaxonômicos, exemplo disso é a família Piperaceae, da qual já foram isoladas diversas amidas.

7- SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

Do ponto de vista químico, apenas parte da fração hexano e clorofórmio foram estudadas, sendo interessante a continuidade do estudo químico destas frações uma vez que foi constatada em estudos pré-liminares a presença de outros compostos não isolados neste trabalho, principalmente da fração clorofórmio, da qual foi isolado o composto *N-trans-p*-coumaroiltiramina, que pertence a um grupo de amidas com atividades biológicas importantes. Também faz necessário o estudo da fração acetato de etila, já que a mesma apresentou uma boa atividade antioxidante, para isolamento e identificação destes compostos. Atividade essa que deve ser testada com outros métodos químicos e biológicos, para obtenção de resultados mais conclusivos, devido à divergência de resultados obtidos entre os métodos aqui utilizados.

Também será interessante prosseguir os estudos farmacológicos com a espécie, visto que a mesma apresenta uso popular e poucos estudos realizados.

E por fim, será interessante também realizar o estudo fitoquímico e biológico de outras partes da planta como as folhas que apresentam uso popular e nenhum estudo até o momento.

REFERÊNCIAS

ALVES, T. M. A.; *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v 95, p. 367-373, 2000.

ARAGÃO, P. C. de A.; *et al.* Substâncias isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima Variabilis*. **Química Nova**. São Paulo, v. 13, n. 4, p. 254-259, 1990.

ASOLINI F. C.; *et al.* Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 209-215, jul-set, 2006.

AYRES M. C. C.; *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18 n. 1, p. 90-97, Jan-Mar, 2008.

BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* MIQUEL, MORACEAE.** Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BENITO, D. M.; *et al.* Triterpenes in elms in Spain. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 35, p. 199-205, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., BRASSICACEAE.** Curitiba, 2001. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Celtis iguanaea. Disponível em: < http://zipcodezoo.com/Plants/C/Celtis_iguanaea >. Acesso em 01/08/2009.

COSTA, C. K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., BIXACEAE e aplicação de seu óleo em formulação cosmética.** Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

COSTA, E. A.; *et al.* **Efeito gastroprotetor do extrato aquoso de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão de galo).** Disponível em: <http://www.fesbe.org.br/regional2008/?resumos/36.019> em 01 de novembro de 2008.

COSTA, J. G. M.; *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

CRONQUIST, A. **An Integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNHA, A. P. da. **Aspectos Históricos sobre Plantas Medicinais, seus Constituintes Activos e Fitoterapia**. Disponível em: < http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf > Acesso em: 08 maio 2008.

CUNHA, W. R. ; *et al.* Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, p. 47-49, 2003.

DIAS, J. F. G. ; *et al.* Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15 n. 3, p. 220-223, Jul-Set, 2005.

DUARTE, M. C. T. ; *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 06-08, 2004.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**. Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L. da; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 318-334, 2001.

Flora Digital do Rio Grande do Sul. Disponível em: < <http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/> >. Acesso em 15/08/2009.

FRIMMEL, A. E.; *et al.* Vitexin, paprazine and terpenoids from *Trema micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v 28, p. 495-496, 2000.

GALICIA, E. H.; *et al.* Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. **Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 118-124, 2002.

GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito Alelopático de Extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças, **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 43-50, jan-mar, 2004.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária, Paraíba**, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2009.

HOLTEZ, F. B.; *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HWANG, B. Y.; *et al.* Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 197-201, 2003.

JOLY, A. B. **Botânica Introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed. Companhia Editora Nacional: São Paulo, 1985.

JUNG, J. M.; HEO, S.; WANG, M. H. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. **Food Chemistry**, Oxford, v 108, p. 482-487, 2008.

JUNG, H. J.; *et al.* Anti-angiogenic activity of the methanol extract and its fractions of *Ulmus davidiana* var. *japonica* **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 112, p. 406-409, 2007.

KIM, J. P.; *et al.* Sesquiterpene O-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. **Phytochemistry**, Oxford, v 23, n. 2, p. 425-430, 1996.

KIM, D. K.; *et al.* Antitumor and Antiinflammatory Constituents from *Celtis sinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, Coreia, v. 28, n. 1, p. 39-43, 2005.

KIM, D. K.; LEE, K. Inhibitory Effect of *Trans-N-p*-Coumaroyl Tyramine from the Twigs of *Celtis chinensis* on the Acetylcholinesterase. **Archives of Pharmacal Research**, Coreia, v. 26, n. 9, p. 735-738, 2003.

KO, J. H.; LIM, K. T. Glycoprotein Isolat From *Ulmus davidiana* NAKAI Protects Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in the Mouse. **Journal of Pharmacological Sciences**, Japão, v 101, p. 205-213, 2006.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A. Sterol Glucosides from *Prunella Vulgaris*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, p. 2351-2355, 1990.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL J. R, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido**. 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993.

KUNDU, J. K.; *et al.* Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 71, n. 5, p. 577-579, 2000.

KUO, W. L.; *et al.* Chemical constituents of *Trema orientalis*. **Chinese Medical Journal**, BeiJing-China, v. 18, n. 1,2, p. 27-36, 2007.

LAGOS, J. B., **Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. JUSS., MELIACEAE**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

LEE, U. D.; *et al.* Immunomodulatory activity of *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae) water and ethanolic extracts on bone cells: Stimulation of proliferation, alkaline phosphatase activity and type I collagen synthesis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v 23, p. 154-161, 2007.

LENTZ, D. L.; *et al.* Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. . **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 63, n. 3 p. 253-263, 1998.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 869, 1999.

MALHEIROS, A.; PERES M. T. L. P. 2001. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 503-523.

MAHATO, S. B.; JUNDI, A. P., ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MENSOR, L. L.; *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEYER, B. N.; *et al.* **Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents**. *Planta medica*, New York, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Editorial Robe, 2000.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha Sistemática de Análise em Fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**. Curitiba, v. 47, n. 1, p. 3-19, 1979.

PALMEIRA, G. A Acupuntura no Ocidente. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 117-128, abr/jun, 1990.

PEITZ, C. **Estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acácia longifolia* Andr. (Willd)**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

PEREIRA, K. C. S.; *et al.* Ausência de efeito genotóxico do extrato de esporão-de-galo em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Resumo do 54º Congresso Brasileiro de Genética**. Salvador Bahia, setembro, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, New York, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIO, C. M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, Córdoba, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RODRIGUES, V. E. G. **Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto do Rio Grande, MG**. Lavras, 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n.2, p. 235-254, 2005.

ROMEIRO, R. de S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

SÁ, R. A. **Constituintes químicos da madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos**. Recife, 2008. Tese (Doutorado em Química) - Setor de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco.

SANCHEZ, I. J. F.; VERPOORTE, R. Secondary metabolism in *Cannabis* **Phytochemistry Reviews**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 615-639, 2008.

SANTOS, A. B. dos. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria da funcionamento da densidade**. São Paulo, 2006. Tese (Doutorado em Física Aplicada a Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

SANTOS, L.S. Atividade Alelopática de Substâncias Químicas Isoladas do Campim-Marandu e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, Viçosa, v.26, n.3, p. 531-538, 2008.

SCHOENFELDER, T.; CIRIMBELLI, C. M; ZANETTE, V. C. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 107, p. 456-459, 2006.

SHIMIZU, M; TOMOO, T. Anti-inflammatory constituents of topically applied drugs V: constituents with antiinflammatory from Aoki (*Aukuba japonica* Thumb.). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v.17, p.665-667, 1994.

SILVA, C. S. P da; PROENÇA, C. E. B. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 481-492, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SINGH, B.; DUBEY, M. M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz *in vivo* and *in vitro*: antimicrobial screening. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 231-234, 2001.

SIQUEIRA, J. M. de; *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* LEACH. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SOLIS, P. N.; *et al.* A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Medica**, New York, v.59, p.250-252, 1993.

SONG, I. K.; *et al.* Anti-inflammatory effect of *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae) on collagen-induced inflammation in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v.23, p. 102-110, 2007.

SPITALER, R.; *et al.* Flavonoids from *Celtis australis* (Cannabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Holanda, v 37, n. 2, p. 120-21, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática - guia ilustrativo para identificação das família de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

STASI, L. C. Di, **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora Afiliada, 1996.

TENE, V.; *et al.* An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 111, p. 63-81, 2007.

YAMAMOTO; *et al.* Analysis and pharmacotoxicity of feruloyltyramine as a new constituent and p-coumaroyltyramine in *Cannabis sativa* L, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Tarrytown, v. 40, n. 3, p. 465-469, 1991.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001.